



Facultad de Medicina
Departamento de Pediatría

ESTUDIO CLÍNICO EXPERIMENTAL DEL PAPEL DEL BAZO EN LA
PREVENCIÓN DE LA ENFERMEDAD DE INJERTO CONTRA HUESPED
EN EL TRASPLANTE INTESTINAL.

Tesis Doctoral

Francisco Hernández Oliveros

Madrid, 2017



Facultad de Medicina
Departamento de Pediatría

ESTUDIO CLÍNICO EXPERIMENTAL DEL PAPEL DEL BAZO EN LA
PREVENCIÓN DE LA ENFERMEDAD DE INJERTO CONTRA HUESPED
EN EL TRASPLANTE INTESTINAL.

Francisco Hernández Oliveros

LUGAR DE INVESTIGACIÓN
IDIPAZ

DIRECTOR DE TESIS
Prof. Dr. Juan Antonio Tovar

TÍTULO AL QUE OPTA:
Memoria para optar al grado de Doctor en Medicina y Cirugía

FECHA DE ENTREGA
13 de noviembre de 2017

A mis hijos y a mis padres, *nova et vetera*

AGRADECIMIENTOS

I. AGRADECIMIENTOS.

Al Dr. Juan Tovar, nuestro profesor unamuniano y director de esta tesis, que me impulsó a sumergirme en el mundo de la investigación.

A Pablo Stringa, mi gran amigo, maestro zen de la cirugía experimental; con total seguridad, el único veterinario del mundo capaz de hacer distintos tipos de trasplantes intestinales; también a Nati y Nacho por dejarnos ser su familia en España.

A Antonio Pérez Martínez, nuestro investigador “romántico”, por su amistad tardía pero auténtica, y por aportar un sentido polisémico al quimerismo.

A María Vela, por su gran ayuda en la realización e interpretación de las citometrías, y por formar un equipo cohesionado y prometedor. También a Tania Rubio, que realizó las determinaciones de laboratorio.

A Montse Arreola, Jose Manuel Zertuche y Suzana Stanisavljevic, que colaboraron con gran entusiasmo y de forma desinteresada en la fase experimental final de esta tesis.

A María del Carmen Méndez, por sentarse con nosotros incluso fuera de su horario laboral para evaluar las numerosas muestras remitidas.

A Esther Ramos que aceptó finalmente su destino. A Gerardo Prieto, por su ejemplaridad, su ética laboral, y su gusto literario. Y a Inma, Lorena, Eva, Manuel Molina, Jesús Sarria; que nos ayudaron a interpretar los datos clínicos.

Al Dr. Manuel López Santamaría, gran pionero del trasplante pediátrico en España; por su ejemplo, su inestimable apoyo, y por brindarme su amistad.

To Dr. T. Tzakis, one of the biggest leaders in transplantation for accepting me for six months and for teaching me as one of his team.

A los Dres. Zou, Wang, Garriboli, Pederiva, Gómez; por su contribución al desarrollo de la línea de investigación que aquí queda resumida. Y muy especialmente a Ane Andrés, continuadora de la línea desde una posición “heterotópica”.

A Pablo, Pedro, José Ignacio, Carlota Largo, Juan Vázquez, Isabel, Mayte, Irene y muchas otras personas del servicio de Cirugía Experimental con las que he tenido la suerte de trabajar.

A las Dras. Marta Navarro Zorraquino y Cristina Pastor Oliver, que me permitieron colaborar en sus proyectos y me integraron en su equipo. Y a Aurora, por su interés.

A José Luis Encinas, mi salvador y consejero en tiempos difíciles; y compañero inseparable, a pesar de la distancia abismal de nuestros planteamientos quirúrgicos.

A Carlos de la Torre, fiel amigo, y único cirujano capaz de distinguir a primera vista las venas de las arterias pulmonares.

To Manuel Gámez, second to none, master of surgeons, king of wisdom...

Al Dr Murcia, “pata negra” del trasplante, a los Dres, Martínez, Lobato, Díaz y Leal, mis residentes mayores; y a Susana Rivas, mi coerre. Y a todos los residentes que llegaron después: Ana, Laura, Satur, Miriam, y otros muchos...

A Juange y Olga, no pude cumplir mi promesa de hacer un triatlón con ellos porque elegí hacer esta tesis, seguro que se alegran por tal decisión y la celebraremos juntos.

A la Dra. Rojo, mi querida y añorada maestra, y al Dr. Palenzuela, por su jesuítica claridad de ideas, su ejemplo moral y espiritual, y su apoyo constante.

A Carlos y Loli, por su amistad incondicional, por su paciencia infinita.

A Elena y Joaquín, la verdadera pareja perfecta, por hacer que todo parezca mejor, y hacer que funcione, que resulte más divertido.

A la ORFC, mi gran tribu.

A Fernando y Uchi, mis padrinos.

A Salvador Broncano, mi gran maestro, que me enseñó que un universitario es aquel que no puede irse a dormir con una duda por resolver, a María, a Antonio y Mariquilla, mis “casi hermanos” pequeños.

A todas las bibliotecas y librerías del mundo, que siempre han avivado mi inquietud al tiempo que sosegaban mi espíritu.

A Carol, mi hermana en la luna, la “gigante estudiante”; Susi, mi hermana-madre; Josemi, el hombre tranquilo; y Juan Carlos, el más digno y bueno de todos nosotros. A Josep, Lucciano, Sandra y Mariángeles, por querer a mis hermanos; algo que no resulta difícil, por cierto.

A Marta, quien finalmente consiguió que me sentara a escribir esta tesis, aun sabiendo que quedaría “viuda” temporalmente en los meses siguientes.

Finalmente, a mis padres, que se empeñaron en enviar a la universidad a sus cinco hijos. Y a Lucía, Rocío y Paco; también a Martita, y a mis sobrinos; a todos ellos espero verlos algún día leyendo un libro a la sombra de un árbol, en algún campus universitario; porque ese será el comienzo de otras historias que estoy deseando que me cuenten, pero desde el principio, claro...

RESUMEN

II. RESUMEN

El intestino fue el último órgano sólido en trasplantarse con relativo éxito, debido a su gran carga inmunológica y bacteriana, que condiciona la aparición de complicaciones infecciosas más graves que las de otros órganos sólidos, y complicaciones inmunológicas más propias del trasplante de médula ósea, como la enfermedad de injerto contra huésped (EICH).

Nuestro grupo fue uno de los primeros en llamar la atención sobre la mortalidad relacionada con la EICH; y fue también el primero en proponer la preservación del bazo nativo en el trasplante multivisceral para evitar el riesgo infeccioso asociado con el estado de asplenia, pero también para disminuir el riesgo de EICH.

Los hallazgos clínicos preliminares nos hicieron buscar un modelo experimental para tratar de descifrar el mecanismo mediante el cual el bazo ejerce su efecto protector, sin embargo, los modelos existentes no ofrecen EICH clínicamente relevante, de manera que desarrollamos las modificaciones técnicas necesarias en el modelo experimental para reproducir la EICH que nos encontramos en la clínica.

El modelo consistió en un trasplante multivisceral modificado (sin hígado) alogénico con el bazo incluido en el injerto. Esto nos permitió desarrollar una escala clínica de valoración de la EICH en animales de experimentación, al tiempo que nos proporcionó un modelo experimental optimizado para estudiar el fenómeno en sí; y en un futuro no lejano, realizar ensayos terapéuticos antes de llevarlos a la clínica.

Esta tesis resume el “camino de ida y vuelta” de la clínica al laboratorio y de laboratorio a la clínica que nos ha permitido mejorar nuestros resultados en el trasplante intestinal.

ÍNDICE

III. ÍNDICE GENERAL

I. AGRADECIMIENTOS.....	5
II. RESUMEN.....	9
III. ÍNDICE GENERAL.....	11
IV. LISTA DE FIGURAS.....	13
V. LISTA DE TABLAS.....	16
VI. LISTA DE GRÁFICAS.....	18
VII. ABREVIACIONES Y SÍMBOLOS.....	20
1. INTRODUCCIÓN.....	22
1.1. <i>Historia del trasplante intestinal</i>	22
1.2. <i>Unidades de Rehabilitación intestinal</i>	23
1.3. <i>Resultados del trasplante intestinal</i>	24
1.4. <i>Enfermedad de injerto contra huésped y trasplante intestinal</i>	24
1.5. <i>Papel del bazo en la enfermedad de injerto contra huésped en el TI</i>	25
1.6. <i>Modelos experimentales de trasplante intestinal e injerto contra huésped</i>	26
1.6.1. <i>Animales grandes</i>	26
1.6.2. <i>Modelos en roedores</i>	27
2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....	30
2.1. <i>Hipótesis</i>	30
2.2. <i>Objetivos</i>	30
3. MATERIAL Y MÉTODOS.....	32
3.1. Estudio clínico.....	32
3.2. Modelo experimental.....	33
3.2.1. <i>Animales</i>	33
3.2.2. <i>Intervenciones quirúrgicas</i>	33
3.3. Diseño experimental.....	41
3.4. Variables analizadas.....	44
3.4.1. <i>Supervivencia</i>	44
3.5. Estadística.....	51
4. RESULTADOS.....	53
4.1. Estudio clínico.....	53
4.2. Modelo experimental.....	56
4.2.1. <i>Seguimiento clínico y supervivencia</i>	56
4.2.2. <i>Estudios de funcionales</i>	58
4.2.3. <i>Citometría de flujo</i>	60
4.2.4. <i>Producción de citoquinas en sobrenadante de cultivo</i>	62
4.2.5. <i>Histología</i>	62
VIII. DISCUSIÓN.....	67
IX. CONCLUSIONES.....	76
ANEXO A: BIBLIOGRAFÍA.....	79
ANEXO B: FUENTES Y RECURSOS DE COMUNICACIÓN CIENTÍFICA.....	83
ANEXO C: ÍNDICE ANTROPONÍMICO.....	85
ANEXO E: CURRÍCULUM VITAE RELACIONADO CON ESTA TESIS.....	86
1. Formación.....	86
2. Premios, becas y estancias en el extranjero.....	86
3. Capítulos de libro.....	86
4. Artículos publicados.....	87
5. Proyectos de investigación.....	89

LISTA DE FIGURAS

IV. LISTA DE FIGURAS

- Figura 1: Imagen microscópica del pedículo del injerto intestinal destacando la aorta abdominal (AA), el tronco celíaco (TC), la arteria mesentérica superior (AMS), la arteria renal derecha (AR), la vena mesentérica superior (VMS), la vena porta (VP), la arteria hepática (AH) y la vena esplénica (VE). 35
- Figura 2: Aspecto macroscópico del injerto de intestino aislado durante la fase de isquemia fría. El color del intestino evidencia un correcto lavado durante la cirugía del donante. 36
- Figura 3: A) Aspecto macroscópico del intestino trasplantado (IT) durante la reperusión inmediata. B) Anastomosis vasculares arterial y venosa. 37
- Figura 4: Trasplante heterotópico de intestino aislado en un animal de la cepa Brown Norway. Imagen del periodo pos-quirúrgico inmediato. La coloración de las ostomías distal (OD) y proximal (OP) evidencian una correcta reperusión del intestino trasplantado. 38
- Figura 5: Injerto multivisceral modificado. A) Vista macroscópica de injerto completo. Se observa la presencia del bazo, y el detalle del estómago abierto, antes de ser suturado en la fase de banco. B) Detalle macroscópico con objetivo macro del pedículo del injerto multivisceral, la sutura marca la vena porta y la pinza el segmento de aorta con el tronco celíaco y la arteria mesentérica superior. C) Ligadura del estómago seccionado. 39
- Figura 6: Fases de las anastomosis vasculares del injerto multivisceral modificado. A) Vena cava y arteria aorta abdominal clampadas. B) Anastomosis portal finalizada. C) Preparación de anastomosis arterial. D) Anastomosis arterial finalizada antes de la reperusión. 40
- Figura 7: A) Aspecto macroscópico del injerto multivisceral modificado después e la reperusión. Destacan en el injerto el estómago (E), el bazo (B), el páncreas (P) y el intestino delgado (ID) que presenta una coloración normal. B) Bazo nativo, extirpado en el grupo MVM-B antes del cierre. C) Estoma terminal del injerto en posición paramedial. 41
- Figura 8: Animal de la cepa Brown Norway receptor de un trasplante alogénico a los 10 días pos-quirúrgicos. En la imagen se observa claramente un abultamiento en la región abdominal derecha del animal ocasionada por un endurecimiento severo del injerto, indicativo de rechazo. 42
- Figura 9: Ejemplo de toma de muestras 7 días postrasplante alogénico. En la imagen se observa el área con erupción cutánea (recuadro) de donde se obtuvo una muestra de piel (flecha roja) para el estudio histopatológico. Por otro lado, se aprecia una correcta coloración de la mucosa del intestino trasplantado (flecha azul). 43
- Figura 10: Imágenes representativas del test de absorción de glucosa en ratas trasplantadas. Se observa la ostomía (A) por donde se administra la solución glucosada (B). Los valores de glucemia se obtuvieron mediante la utilización del sistema de medición de glucemia Accu-Chek (Roche) (C). 45
- Figura 11: A) Signos marcados de erupción cutánea en región periocular, nasal y pabellón auricular de un animal de la cepa Brown Norway. C) Detalle de erupción cutánea en región periocular. E) Erupción cutánea en piel de región

abdominal. Las figuras B, D y F corresponden a animales control (sin ningún tipo de intervención).....	46
Figura 12: Gráfica comparativa de supervivencia acumulada en pacientes en los que se preservó el bazo nativo en comparación con los que fueron esplenectomizados, y con aquellos en los que se incluyó el bazo alogénico en el injerto (test log-Rank: $p<0,05$)	55
Figura 13: Imagen de la cavidad abdominal de un receptor de TxMVM alogénico sin tratamiento IS a los 10 días postrasplante. Se aprecia una marcada esplenomegalia del bazo trasplantado (BT) y signos macroscópicos de rechazo en el intestino trasplantado (IT). En cuanto a los órganos nativos del receptor, no se observan alteriaciones en el intestino delgado nativo (IDN). Sin embargo, se aprecia hepatomegalia con la característica presencia de bordes redondeados (flecha celeste).....	57
Figura 14: Fotografías realizadas con 4,20 y 40X, de muestras de intestino trasplantado después de 10 días, tinción con HE. A) EICH grado III (20x), B) EICH grado IV (40x), C) Rechazo moderado con apoptosis confluyente (40x), D) Rechazo agudo celular grave.	63
Figura 15: En la imagen de la izquierda, se observa el bazo nativo (BN) del animal receptor de trasplante MVM+PB(superior) y el bazo del injerto (Lew) (inferior). En el gráfico boxplot de la derecha se representan los pesos de los bazos trasplantados, nativos y controles (** $p<0,01$; *** $p<0,001$; Test ANOVA+Tukey).....	64
Figura 16 : Disección del pedículo esplénico en receptor de trasplante multivisceral. El páncreas, el duodeno y el estómago seccionado se encuentran a la derecha de la cavidad para mejorar la exposición. El injerto de aorta ya sido colocado para la posterior anastomosis con el injerto multivisceral y se encuentra clampado.....	69
Figura 17: Detalle del pedículo esplénico nativo después del implante del injerto multivisceral en un niño. Se observa la vena porta nativa anastomosada a la vena cava inferior del injerto (se realizó implante con técnica de <i>piggy-back</i>). Inmediatamente cefálica a la vena porta se encuentra la arteria esplénica que ha sido desclampada, la pinza de la derecha de la imagen sujeta el muñón de la arteria hepática. A la izquierda de la imagen se observa la anastomosis del injerto de arteria aorta.....	70

LISTA DE TABLAS

V. LISTA DE TABLAS

Tabla 1: Panel de anticuerpos marcados determinados mediante citometría de flujo.....	48
Tabla 2: Niveles de rechazo celular agudo en trasplante de intestino humano, consensuado durante la reunión de trabajo de patología del <i>VIIIth international Small Bowel Transplant Symposium</i> , Miami, Florida, 2003 ⁴⁴	50
Tabla 3: Clasificación histológica de la EICH intestinal.....	50
Tabla 4: Estadios de EICH cutánea según criterios histopatológicos en biopsia de piel humana.....	50
Tabla 5: Tabla de contingencia de EICH en pacientes agrupados en función de la presencia o no de bazo tanto nativo como trasplantado.....	53
Tabla 6: Tabla de contingencia de anemia hemolítica postrasplante en pacientes que recibieron un injerto intestinal agrupados por la presencia o no de bazo nativo y trasplantado.....	54
Tabla 7: Porcentaje de EICH o anemia hemolítica y mortalidad en pacientes que recibieron un injerto intestinal agrupados según la presencia o no del bazo nativo y trasplantado.....	55

LISTA DE GRÁFICAS

VI. LISTA DE GRÁFICAS

- Gráfica 1: Tinción con el anticuerpo anti MHC RT1 [a,b,l], anti CD3, anti CD4 y anti CD8 de sangre periférica de ratas Lewis y Brown Norway. Se muestra un histograma de tamaño y complejidad sobre el que selecciona la población linfocitaria. Sobre ésta, se selecciona Tinción con el anticuerpo, se selecciona la población CD3+. Se muestra el porcentaje de células CD4+ y CD8+ dentro de las poblaciones MHC RT1 [a,b,l]+ (células Lewis) y MHC RT1 [a,b,l]- (células Brown Norway). 48
- Gráfica 2: A- las curvas representan el momento de sacrificio y muestreo de los receptores alogénicos con y sin preservación de bazo. Los receptores isogénicos presentaron una excelente supervivencia prolongada post-trasplante. Figura B: La clínica de EICH (rash cutáneo) se presentó con mayor frecuencia en el grupo de ratas esplenectomizadas (4/4 vs 2/5, test χ^2 , $p < 0,05$), y los signos de rechazo fueron menores en dicho grupo (0/4 vs 3/5, test χ^2 , $p < 0,05$) 57
- Gráfica 3: representación “box plot” comparativa de parámetros de función hepática y renal en ratas receptoras de TIA (trasplante de intestino aislado) MVM-B (trasplante multivisceral modificado con esplenectomía) y MVM+PB (trasplante multivisceral modificado con preservación de bazo nativo). * $p < 0,5$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ 58
- Gráfica 4: Curvas de glucemia tras la administración de glucosa intraluminal a través del estoma del injerto intestinal en los grupos: control, trasplante multivisceral modificado isogénico (MVM ISO), trasplante multivisceral modificado con esplenectomía (MVM-B) y trasplante multivisceral modificado con preservación de bazo nativo (MVM+PB). * $p < 0,05$ 59
- Gráfica 5: Análisis mediante citometría de flujo del porcentaje de células T Lewis MHC RT1 [a,b,l]+ en sangre periférica de ratas receptoras Brown Norway a diferentes días postrasplante en los grupos TIA, MVM-B y MVM+PBN. Se muestra el porcentaje de células CD4+ y CD8+ dentro de las poblaciones MHC RT1 [a,b,l]+ (células Lewis) y MHC RT1 [a,b,l]- (células Brown Norway) * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ 60
- Gráfica 6: Tinción con el anticuerpo anti MHC RT1 [a,b,l] anti CD3, anti CD4 y anti CD8 de sangre periférica de ratas Lewis y Brown Norway. Se muestra un histograma de tamaño y complejidad sobre el que se selecciona la población linfocitaria. Sobre esta, se selecciona la población de CD3+. Se muestra el porcentaje de células CD4+ y CD8+ dentro de las poblaciones MHC RT1 [a,b,l]+ (células Lewis) y MHC RT1 [a,b,l]- (células Brown Norway) 61
- Gráfica 7: Gráfico de barras representando los niveles de IL-2, IFN-g y TNF-a en ratas receptoras de trasplante de intestino aislado (TIA) y trasplante multivisceral modificado (MVM) los días 3, 7 y 9-10. 62

ABREVIACIONES Y SÍMBOLOS

VII. ABREVIACIONES Y SÍMBOLOS

AA: aorta abdominal.

AMS: arteria mesentérica superior.

BN: Brown Norway.

DPT: día postrasplante.

DS: desviación estándar

EICH: enfermedad de injerto contra huésped.

FI: fallo intestinal.

MVM: multivisceral modificado.

NP: nutrición parenteral.

TI: trasplante intestinal.

VP: vena porta.

INTRODUCCIÓN

1. INTRODUCCIÓN.

1.1. Historia del trasplante intestinal

El trasplante intestinal (TI) ha sido el último de los trasplantes de órgano sólido en incorporarse a la práctica clínica, debido a los malos resultados obtenidos en los primeros intentos, antes de la llegada de los nuevos inmunosupresores. Además del retraso, la evolución del TI se ha caracterizado por una curva de aprendizaje escalonada, con de saltos de gigante en algunas ocasiones, y lastrada por grandes decepciones en otras. Afortunadamente, en los últimos años ha pasado de ser un procedimiento casi esotérico a constituir el estándar de tratamiento de pacientes seleccionados con fallo intestinal ¹.

El Primer intento de trasplantar el intestino fue llevado a cabo por Alexis Carrel a principios del siglo XX. Richard Lillehei retomó el trabajo experimental en 1950, con las primeras descripciones de la técnica quirúrgica y la preservación del injerto ^{2,3}.

La conocida necesidad del TI fue enfatizada por el desarrollo de la nutrición parenteral (NP) y del concepto de fallo intestinal (FI). La NP fue introducida por Dudrick y Wilmore, del *Children Hospital of Philadelphia*, en los años 60' precisamente para evitar el fallecimiento de niños con intestino corto⁴. El éxito de la nutrición parenteral puso de manifiesto las complicaciones relacionadas con su administración, sobre todo las relacionadas con el uso inherente de un catéter central, infecciones y trombosis; y la hepatopatía. Se han propuesto múltiples definiciones de FI, la más aceptada en la reducción de la masa de intestino funcional por debajo del mínimo necesario para mantener una adecuada digestión y absorción de nutrientes y líquidos para mantener la vida en el adulto; y adicionalmente el crecimiento en niños. En los países desarrollados, el FI se produce mayoritariamente en pacientes con problemas congénitos de presentación muy precoz. La mayor parte de estos pacientes presentan síndrome de intestino corto, convirtiendo este cuadro en la causa más frecuente de FI. De nuevo Lillehei, llevó a cabo el primer intento de TI clínico en 1967, animado por la posibilidad técnica y el ambiente de optimismo que generó la aparición de los primeros inmunosupresores (esteroides y azatioprina, etc.) ⁵. El resultado fue

catastrófico, al igual que en los intentos esporádicos que se sucedieron en los siguientes años. El TI quedó virtualmente abandonado entre los años 1970 y 1980.

La llegada de la ciclosporina, a principios de los 80 renovó el interés por el TI. Olivier Goulet (Paris) David Grant (London, Canadá) y Eberhard Deltz (Kiel) fueron algunos de los grandes pioneros de esta nueva época en la que se consiguió por primera vez supervivencia a largo plazo tras el trasplante de intestino aislado y hepatointestinal combinado. El liderazgo durante los años 90 correspondió al grupo de Pittsburgh que consolidó el procedimiento y ejerció de escuela para la apertura posterior de programas de TI en todo el mundo.

El siguiente gran hito en la historia del TI fue la aparición del inmunosupresor tacrolimus, que cambió drásticamente el pronóstico de esta modalidad de trasplante, impulsando la introducción del procedimiento en los principales centros de trasplante.

1.2. Unidades de Rehabilitación intestinal.

En el siglo XXI, el TI es una herramienta fundamental que se integra en las llamadas unidades de rehabilitación intestinal (URI), junto con el soporte nutricional, el tratamiento médico y la cirugía reconstructiva del fallo intestinal. Tras el auge inicial, las cifras anuales de TI realizados en el mundo ha seguido una tendencia decreciente, sobre todo por la mejoría en el manejo del FI. La misma sociedad internacional de trasplante intestinal (Intestinal Transplant Asociation, ITA) cambió su nombre en su último congreso por el de Asociación Internacional de Rehabilitación y Trasplante Intestinal (Intestinal Rehabilitation and Transplantation Asociation) reconociendo la realidad a la que han evolucionado la mayoría de las unidades de TI.

La autonomía digestiva tras el TI es bastante alta, en torno al 80%; sin embargo, el gran éxito de las URI no radica en el TI sino en el hecho de que muchos pacientes referidos para TI consiguieron autonomía digestiva sin necesidad de trasplante, señalando la importancia crucial del abordaje multidisciplinar en el manejo del FI.

1.3. Resultados del trasplante intestinal.

En los últimos años ha pasado de ser un procedimiento experimental a convertirse en un procedimiento seguro, con muy buenos resultados a corto plazo. En cuanto a los resultados a largo plazo, según los datos del Registro Internacional de trasplante Intestinal (IITR) no se ha conseguido la mejoría esperada ⁶⁻⁹. Las causas más frecuentes de fallo del injerto y fallecimiento del paciente siguen siendo el rechazo y las infecciones .

La mayoría de los pacientes referidos para TI pertenecen a la edad pediátrica, es lógico por tanto, que la mayor parte de la literatura y la experiencia se centre en este grupo de pacientes.

La efectividad del TI se ha demostrado en términos de independencia de la NP, estado nutricional y crecimiento. El beneficio global del TI en términos de calidad de vida es difícil de cuantificar, debido a la falta de escalas específicas de calidad de vida validadas para estos pacientes. Sin embargo, los análisis preliminares de los datos disponibles parecen demostrar mejoría en la calidad de vida tras el trasplante de intestino. Los análisis efectividad han demostrado que el TI resulta coste-efectivo a partir del tercer año. Estas conclusiones, no obstante, son solo aplicables para el TI aislado, ya que en los candidatos que precisan la inclusión del hígado en el injerto, la NP no es una alternativa y no procede la comparación.

1.4. Enfermedad de injerto contra huésped y trasplante intestinal.

Los criterios originales para el desarrollo de la enfermedad de injerto contra huésped (EICH) fueron establecidos por Billingham en 1966 ¹⁰ Incluía tres requisitos: el injerto debe contener células inmunocompetentes, el receptor debe expresar antígenos no presentes en el donante, y el receptor debe ser incapaz de eliminar las células trasplantadas.

La fisiopatología de la EICH constituye una respuesta exagerada por parte de los sistemas inmunes del injerto y el receptor. El tejido del receptor s encuentra dañado previamente, por la enfermedad de base, infecciones, o los regímenes de acondicionamiento, en el caso de TI por la inmunosupresión recibida. Y el tejido

del donante se expone a un ambiente extraño. Estos dos fenómenos desencadenan una “tormenta” de citoquinas proinflamatorias que incluye IL-1, IL-2, IL-6, IL-12, IL21, IL-23, TNF y TNF- α

La enfermedad de injerto contra huésped (EICH) es una de las complicaciones más graves del trasplante intestinal, y en muchos casos conduce a la muerte del paciente ¹¹. Nuestro grupo cuenta con una considerable experiencia en trasplante intestinal en clínica humana (103 trasplantes en el momento de la redacción de esta tesis) ello nos ha permitido observar en las complicaciones del trasplante intestinal, entre ellas la EICH, con una mortalidad próxima al 50% ¹². Debido a la mayor carga linfocitaria, la EICH es más frecuente en las modalidades de trasplante multivisceral (TMV) y multivisceral modificado (TMVM).

1.5. Papel del bazo en la enfermedad de injerto contra huésped en el TI.

El bazo ha sido considerado un “órgano olvidado”, ya que se le dedican muy pocos estudios en proporción a su importancia en el sistema inmune. Se trata del mayor órgano del sistema linfoide, tiene una actividad hematopoyética, actúa como filtro eliminando hematíes dañados; y desempeña un papel crucial en la defensa contra virus y gérmenes capsulados. Pero además actúa en la vía del complemento y regula la inmunidad adaptativa y la innata a través de su acción sobre linfocitos B y monocitos respectivamente ¹³.

La importancia del bazo y el riesgo reconocido de fallecimiento por infecciones graves en pacientes esplenectomizados ¹⁴, ha dado lugar a la limitación de las indicaciones de esplenectomía tanto en pacientes politraumatizados como en enfermedades hematológicas. En el TI, sin embargo, durante años se realizó esplenectomía casi rutinaria en receptores de TMV simplemente para incrementar el espacio abdominal disponible para albergar el injerto. La elevada mortalidad relacionada con infecciones y la incidencia notable de enfermedad de injerto contra huésped se comenzó a incluir el bazo en el injerto multivisceral. Se consiguió de esta forma evitar la situación de asplenia, pero la inclusión del bazo alogénico demostró disminuir el riesgo de rechazo, pero también demostró tener efectos negativos, ya que incrementó la tasa de anemia hemolítica y EICH ^{12,15,16}.

Por otro lado, se desarrolló la técnica de preservación del bazo junto con el complejo duodeno-páncreas para disminuir el riesgo de infecciones, en concreto la enfermedad linfoproliferativa postrasplante (ELPPT); con las potenciales ventajas adicionales de mantener el flujo portal durante el implante, evitar la anastomosis biliar y aumentar la masa de islotes pancreáticos funcionantes ¹⁷. La preservación del bazo nativo en pacientes con poliposis adenomatos familiar que recibieron un TMVM demostró disminuir el riesgo de ELPT y de EICH¹⁸. Nuestro grupo, tratando de dar una solución a la EICH, introdujo la técnica de preservación del bazo nativo en los receptores de TMV, en estos casos la técnica es algo más compleja que la empleada en los receptores de TMVM, ya que el hígado se incluye en el injerto, y por tanto no se preserva del complejo duodeno-páncreas. De manera que el bazo nativo es preservado de manera aislada, obligando al clampaje de su pedículo durante la fase de implante. Al finalizar la fase vascular del implante, la vena porta nativa se conecta con la cava infrahepática del injerto y se desclampa la arteria esplénica, restableciendo el flujo esplénico. Los resultados preliminares demostraron una disminución significativa del riesgo de anemia hemolítica y EICH en los pacientes en los que se preservó el bazo comparados con los que fueron esplenectomizados ¹⁹.

En ninguno de los trabajos mencionados se explica el mecanismo mediante el cual el bazo ejerce su función protectora, lo que nos invita a investigar las posibles vías de acción tanto en la clínica como en la investigación experimental.

1.6. Modelos experimentales de trasplante intestinal e injerto contra huésped.

1.6.1. Animales grandes.

El trasplante de intestino experimental fue descrito por primera vez en un modelo canino ² y posteriormente se emplearon cerdos, y muy raramente primates ^{20,21}. Estos modelos han sido muy importantes para el desarrollo de la técnica quirúrgica, el estudio de la preservación y función del injerto, así como el diagnóstico del rechazo celular agudo ²². El modelo porcino se empleó para

demostrar que el drenaje portal no ofrecía beneficios significativos en comparación con el drenaje sistémico ²³ También han demostrado gran utilidad en estudios farmacológicos de nuevas drogas y regímenes inmunosupresores ^{24,25}. También se han ensayado terapias alternativas como la infusión de antígenos del donante, aunque la infusión de antígenos del donante demostró efectos perjudiciales, la infusión portal de sangre del donante disminuyó el rechazo y prolongó la supervivencia del injerto ^{26,27}.

1.6.2. Modelos en roedores.

El TI en ratas fue descrito por primera vez en 1971 por Monchik y Russell ²⁸ en un trabajo seminal en el que además de describir la técnica quirúrgica, destacan el interés del modelo para el estudio de la EICH. El modelo en roedores es relativamente barato, y ofrece la ventaja de los modelos *knock-out* y un gran arsenal de herramientas para estudio inmunológicos relacionados con el rechazo y la EICH. Un inconveniente considerable es que el modelo es muy exigente y requiere una dura curva de aprendizaje antes de obtener una supervivencia aceptable; dependiendo de la experiencia y la habilidad, pueden ser necesarios unos 50 procedimientos ^{29,30}.

El modelo ortotópico, con restablecimiento de la continuidad intestinal, es el que mejor reproduce la fisiología del trasplante clínico. El llamado modelo heterotópico es relativamente más sencillo y tiene una mortalidad menor, ya que no se reseca el intestino nativo, y el intestino trasplantado queda cerrado en el extremo proximal y derivado mediante ileostomía en su extremo distal. Las anastomosis vasculares son similares en ambos procedimientos.

Dejando a un lado la técnica empleada, la mayoría de los trabajos publicados, incluidos los de nuestro grupo, se han centrado en el estudio de la isquemia-reperfusión y el rechazo ³¹⁻³⁵. Muy pocos estudios se han dedicado a la EICH, además del descrito de Monchick y Russell; destaca el modelo semi-alotópico de ratas WF-into-F1 (WFxACI), descrito por Kobayashi es el que mejores resultados ha proporcionado³⁶. Con dicho modelo, Song et al, demostraron que la administración durante 14 días del inmunosupresor FTY720, favorece el secuestro de las células T derivadas del donante en el intestino injertado, disminuyendo la respuesta inmune Th1 en los órganos diana durante la EICH ³⁷.

El objetivo del presente proyecto es desarrollar un modelo experimental, en ratas, que reproduzca en un alto porcentaje de animales la EICH, con un número reducido de complicaciones, que disminuya la mortalidad asociada con frecuencia en este tipo de procedimiento. Adicionalmente, estudiaremos el papel del bazo en la aparición nativo y trasplantado en este tipo de trasplante, ya que se ha observado un papel aparentemente protector del bazo nativo, sin que se conozca el mecanismo que lo justifique.

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.

2.1. Hipótesis

1. En la clínica, la preservación del bazo nativo en el receptor de trasplante multivisceral disminuye el riesgo de EICH y anemia hemolítica.
2. En el modelo experimental, el trasplante multivisceral modificado produce EICH equivalente a la observada en la clínica.
3. En el modelo experimental, la preservación del bazo nativo en el receptor de trasplante MVM disminuye el riesgo de EICH.

2.2. Objetivos

1. Demostrar en una población de más de 100 pacientes trasplantados que la preservación del bazo nativo previene o atenúa el desarrollo de EICH y anemia hemolítica postrasplante.
2. Desarrollar un modelo experimental reproducible de trasplante MVM, que presente un cuadro de EICH equivalente al que aparece en la clínica en el TI.
3. Demostrar que la preservación del bazo nativo en el modelo experimental de TMVM alogénico, previene o atenúa el desarrollo de EICH.

MATERIAL Y MÉTODOS

3. MATERIAL Y MÉTODOS.

3.1. Estudio clínico

Se incluyeron todos los pacientes que recibieron una trasplante intestinal en cualquiera de sus variantes, en el Hospital Universitario La Paz entre 1999 y 2016. En total, se realizaron 103 trasplantes en 81 pacientes. Por tipo de injerto, la distribución fue la siguiente: 22 hepatointestinales, 26 intestino aislado, 52 multivisceral; y 3 multivisceral modificado. La indicación más frecuente de trasplante fue la de síndrome de intestino corto (68%), seguida de trastorno de motilidad (18%), y diarrea intratable (10%). Como indicaciones primarias no descritas anteriormente, destacó una paciente con Síndrome de Martínez Frías, y un hepatoblastoma irresecable con trombosis portal extensa. El colon se incluyó en el injerto desde 2012 en todos los pacientes (22). La terapia de inducción consistió en basiliximab en menores de 4 años y alentuzumab en mayores de 4 años o retrasplantes. El tacrólimus fue la monoterapia de mantenimiento en casi todos los pacientes, aunque en el último periodo el sirolimus demostró ser una buena alternativa en monoterapia o combinado con tacrolimus a bajas dosis. El 28% de los pacientes presentaron rechazo celular agudo, la pérdida del injerto ocurrió en el 31% de los casos. El retrasplante con un segundo injerto fue necesario en el 21% de los casos, y con un tercer injerto en el 6%. Destaca en esta serie que todos los casos que recibieron retrasplante con un intestino aislado requirieron un tercer injerto por pérdida del mismo. En cambio, los pacientes con intestino aislado que fueron retrasplantados con un injerto multivisceral mostraron similares a la serie general. La supervivencia global de los pacientes retrasplantados fue del 63%. La incidencia de síndrome linfoproliferativo postrasplante fue del 18%, la de EICH del 14% y la de anemia hemolítica del 15%. Después de una media de seguimiento de 7.1 años, la supervivencia global es del 64%, y todos los pacientes en seguimiento consiguieron autonomía digestiva completa.

En la serie resumida anteriormente, se analizó la supervivencia, la incidencia de EICH y anemia hemolítica postrasplante en función de la presencia o

no del bazo, tanto el nativo como el del injerto. La incidencia de EICH y anemia hemolítica se analizó de forma conjunta, ya que se ha observado que suelen presentarse de forma concomitante^{38,39}, y para algunos autores, la citopenia o anemia hemolíticas postrasplante no medicamentosas, son formas menores de EICH.

3.2. Modelo experimental.

3.2.1. Animales:

Donante: ratas macho de 200-300g, Wistar-Furth (WF). Receptor: ratas macho Brown Norway. Fueron alojadas alojadas en las instalaciones del Hospital Universitario La Paz, al menos, cuatro días antes de los experimentos, alimentadas con granulado especial para rata hasta la noche antes de la intervención y agua de bebida “ad libitum”. Su manejo se ajustó a las exigencias vigentes en la UE (EC86/L609) y a las recogidas en el RD 223/1988.

3.2.2. Intervenciones quirúrgicas:

- **Anestesia y medidas perioperatorias:** tanto en donante como en receptor usamos anestesia inhalada con Isoflurano (5% durante la inducción y 1,5-2% durante el resto de la intervención) manteniendo un flujo de O₂ de 1l/h; se perfundió con glucosalino 1/5 iv mediante canalización de la vena lateral de la cola con catéter de 24G, a un ritmo de 5ml/h. Alternativamente, cuando la canalización no se consiguió, se administraron 5ml de la misma solución por vía subcutánea en la zona inguinal o abdominal. Se administró clohidrato de tramadol como analgésico (20-30mg/kg vía sc). Se usó una manta térmica durante el procedimiento. Se realizó antisepsia de la pared abdominal con povidona yodada.
- **Material quirúrgico:** se empleó instrumental de cirugía convencional sin la utilización de elementos de magnificación para la laparotomía xifo-púbica inicial. En los siguientes pasos se empleó instrumental microquirúrgico

- **Operación de donante de injerto de intestino aislado:** consistió en la obtención de un injerto de intestino delgado desde unos 3cm del ligamento de Treitz hasta 3cm de válvula ileocecal con pedículo basado en aorta (incluyendo arteria mesentérica superior y tronco celíaco) y vena porta. Tras completar la laparotomía y colocar los separadores, se seccionó el ligamento de Treitz y se disecó la arteria mesentérica superior (AMS). A continuación, se realizó la rotación del intestino de manera que quedó el delgado hacia la izquierda y el grueso hacia la derecha del operador. Esta maniobra, que tiene como misión colocar al injerto en una posición óptima para no volver a manipularlo durante el resto de la cirugía, se realizó sujetando el ciego y girando las asas del intestino delgado por debajo del grueso, en sentido de las agujas del reloj. El intestino se cubrió con una gasa para evitar pérdida excesiva de calor y humedad. Se disecó y seccionó el extremo distal del injerto, se disecó, coaguló y seccionaron la arteria y vena ileocecocólicas, para ascender por el colon hasta la vena cólica izquierda; la cual se disecó, coaguló y seccionó. Se separó el páncreas del colon a través de un plano avascular identificable por la diferencia de color del páncreas con respecto a la grasa del meso. El paso siguiente consistió en disecar la vena cólica media, que a continuación se coaguló y se seccionó. Con este paso, finalizó la disección del intestino grueso, que se rechazó hacia el lado derecho del campo quirúrgico. Posteriormente, se identificó y seccionó el extremo proximal del injerto, a nivel del yeyuno proximal; se disecaron, coagularon y seccionaron los vasos duodenales, pancreáticos, y de parte del yeyuno que quedaron excluidos del injerto. A continuación, se realizó la disección de la vena porta (VP) de tejidos adyacentes; se disecaron, coagularon y seccionaron las venas esplénica y pilórica, la arteria hepática y el colédoco. Estos últimos pasos descritos constituyen la parte más delicada del procedimiento, y es donde se cometen la mayoría de los errores de la cirugía del donante. En la etapa final del procedimiento, se preparó el campo operatorio para realizar el lavado del injerto disecando y ocluyendo la arteria aorta abdominal (AA) infrarrenal, y proximal a la AMS mediante el uso de clamps vasculares. A partir de este momento, el injerto entró en la fase de isquemia, por lo tanto, los siguientes pasos se practicaron con la mayor rapidez posible: canulación de la AA con

catéter de teflón 24G, sección tan distal como fue posible de VP y perfusión fría, administrando 5 ml de Celsior heparinizado (10 UI/ml) a 4º. Durante este paso se eliminó la sangre contenida en el injerto, adoptando el intestino un aspecto pálido, que se consideró óptimo cuando careció de zonas rosadas o petequiales (Figura 2). Por último, se seccionó la AMS en su origen en la AA y se colocó el injerto en la solución de preservación fría (Figura 1). Una vez en banco, se procedió a la identificación del pedículo vascular del injerto, compuesto por VP y AMS y colocó el injerto en una gasa, también sumergida en la solución, en una posición correcta para evitar la rotación del pedículo vascular durante el implante. En los casos en los que la VP presentó dificultad por su tamaño o longitud, resultó útil la colocación de un punto de sutura referido con microclamp, para evitar su deslizamiento, que fue utilizado en la fase de implante como punto del extremo correspondiente.

Figura 1: Imagen microscópica del pedículo del injerto intestinal destacando la aorta abdominal (AA), el tronco celíaco (TC), la arteria mesentérica superior (AMS), la arteria renal derecha (AR), la vena mesentérica superior (VMS), la vena porta (VP), la arteria hepática (AH) y la vena esplénica (VE).

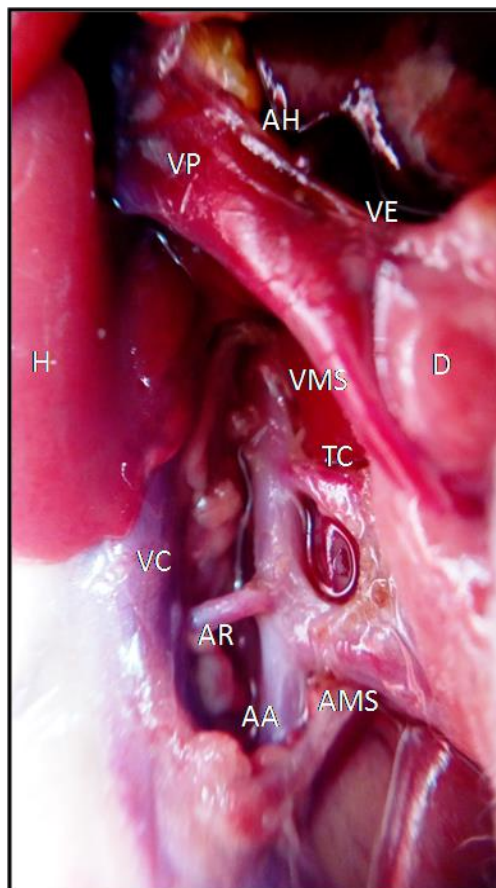


Figura 2: Aspecto macroscópico del injerto de intestino aislado durante la fase de isquemia fría. El color del intestino evidencia un correcto lavado durante la cirugía del donante.



Receptor de trasplante de intestino aislado: El procedimiento quirúrgico en el receptor tiene como principales objetivos revascularizar el injerto de manera adecuada para lograr una buena viabilidad del intestino trasplantado y alcanzar una supervivencia postquirúrgica del receptor acorde al propósito de estudio por el cual se realicen los procedimientos.

El concepto de aclimatación y peso de los animales fue el mismo que se utilizó para los donantes. Sin embargo, en los receptores no se realizó ayuno sólido, por lo que el animal recibió agua y comida *ad-libitum* hasta el momento de la cirugía.

La administración de fluidos en el receptor se realizó vía subcutánea tal como se describió previamente o vía endovenosa a través de las venas laterales de la cola con un catéter de teflón N°24, administrando un volumen de 0.75 ml/min desde el inicio de la cirugía hasta la reperusión del injerto. Cuando se optó por la vía subcutánea, una vez reperfundido el injerto, se administraron de 3 a 5 ml extras de Solución Fisiológica en bolo por vía endovenosa.

Una vez abordada la cavidad abdominal, se disecó la AA y la vena cava (VC) abdominal, ambos vasos a nivel infra renal. Se comenzó con la anastomosis venosa, se clampó la vena cava infrarrenal con clamp vascular curvo, se realizó un ojal ligeramente mayor que el tamaño de la VP del injerto, y se realizó anastomosis termino-lateral con sutura continua usando monofilamento de Nylon 9/0, primero la cara posterior y después la anterior. Se colocó un microclamp en la VP del

injerto y se liberó el clamp de la cava, restableciendo el retorno venoso. Tras comprobar la permeabilidad y estanqueidad de la anastomosis, se realizó la anastomosis arterial con una técnica similar, el ojal en este caso fue de tamaño similar al de la arteria del injerto. Concluidas la anastomosis arterial, se retiró el clamp venoso de la VP y después el clamp de la AA, dando paso a la reperfusión. En los casos en los que las anastomosis habían sido confeccionadas de manera adecuada y la restauración del flujo sanguíneo fue correcta, el intestino trasplantado cambió su aspecto de pálido a rosado (Figura 3).

En el trasplante heterotópico, el intestino trasplantado fue exteriorizado mediante dos ostomías (una proximal y una distal) realizadas en la pared abdominal derecha del animal. Las mismas se efectúan mediante técnica de eversión de mucosas con sutura de Nylon monofilamento 7-0. En términos generales, 6-8 puntos simples fueron suficientes para confeccionar las ostomías (Figura 4).

Figura 3: A) Aspecto macroscópico del intestino trasplantado (IT) durante la reperfusión inmediata. B) Anastomosis vasculares arterial y venosa.

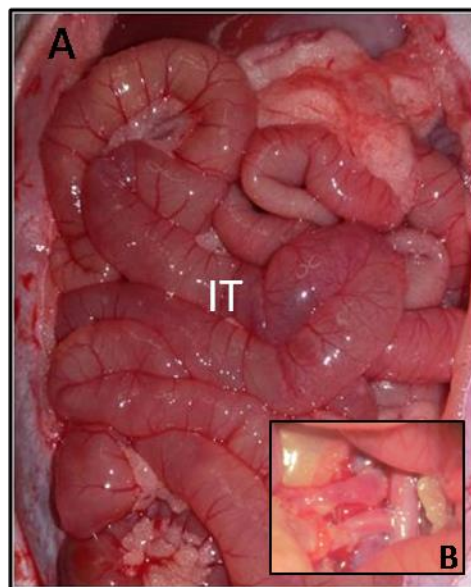
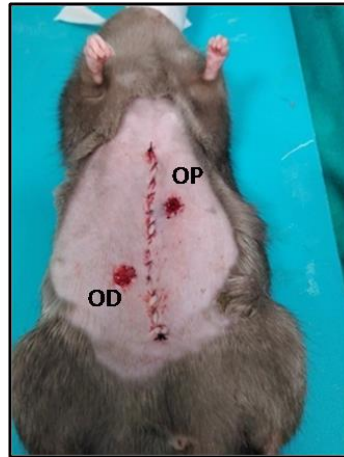


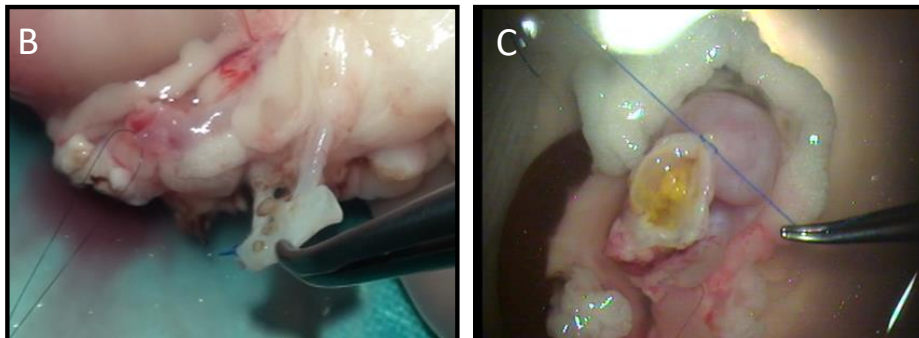
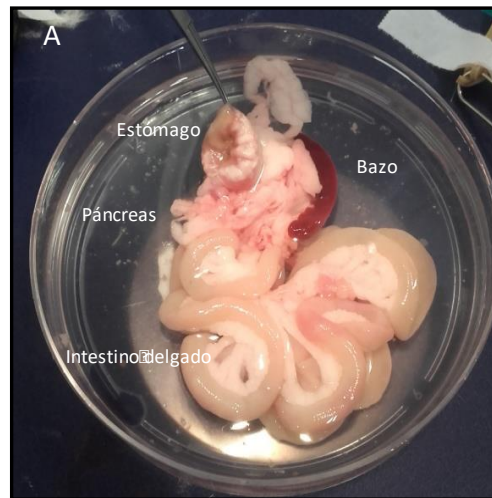
Figura 4: Trasplante heterotópico de intestino asilado en un animal de la cepa Brown Norway. Imagen del periodo pos-quirúrgico inmediato. La coloración de las ostomías distal (OD) y proximal (OP) evidencian una correcta reperusión del intestino trasplantado.



Operación de donante de injerto multivisceral modificado: obtención de injerto multivisceral incluyendo estómago, duodeno, páncreas, bazo e intestino delgado hasta 3cm de válvula ileocecal con pedículo basado en aorta (incluyendo arteria mesentérica superior y tronco celíaco) y vena porta. Los primeros pasos de la intervención fueron similares a los descritos para el injerto de intestino aislado. La gran diferencia fue que en este caso se evitó la disección del duodeno-páncreas, precisamente la parte más delicada y con mayor riesgo de hemorragia. El bazo y el estómago se desplazaron a la derecha de la cavidad, se coagularon con bipolar los vasos anteriores y posteriores al esófago, y se seccionó el mismo junto con la parte apical del estómago tras colocar una ligadura no absorbible en la parte inmediatamente inferior a la unión esofagogástrica; alternatively, este último paso se evitó en algunos casos, limitándonos a seccionar el estómago, y dejando la ligadura para el banco. A continuación, se desplazó aún más el estómago hacia la derecha de la cavidad y se continuó la disección hasta exponer la aorta y sus ramas principales por su lado izquierdo. Se seccionaron la arteria hepática y el colédoco, quedando el injerto preparado para la perfusión. Este paso se realizó de la manera descrita anteriormente, se seccionó la porta en su bifurcación, se clampó la aorta cerca de la bifurcación ilíaca y por encima del tronco celíaco; y se perfundió la solución fría (Celsior heparinizado, a una temperatura de 4°C). Acabada la perfusión, se seccionó la aorta distal y se ligó proximal al tronco celíaco, al igual

que la ligadura del estómago, este paso también se realizó en algunos casos en el banco (Figura 5).

Figura 5: Injerto multivisceral modificado. A) Vista macroscópica de injerto completo. Se observa la presencia del bazo, y el detalle del estómago abierto, antes de ser suturado en la fase de banco. B) Detalle macroscópico con objetivo macro del pedículo del injerto multivisceral, la sutura marca la vena porta y la pinza el segmento de aorta con el tronco celíaco y la arteria mesentérica superior. C) Ligadura del estómago seccionado.



Cirugía de banco: Tanto en el caso del injerto intestinal aislado como en el multivisceral modificado se eliminaron los restos de heces mediante expresión antegrada o mediante lavado con solución de preservación fría con baja presión. En el caso del MVM se realizó sutura del estómago, si no se realizó durante la extracción del injerto; se marcó la vena porta con sutura de 9/0 en el punto que sería utilizado posteriormente como extremo inferior de la anastomosis; se suturó de fuera hacia dentro de la luz, de manera que el mismo punto sirvió para unirlo a

extremo correspondiente de la aorta del receptor (**¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.**). En cuanto al segmento de aorta, si no se realizó ligadura en uno de los extremos, se realizó en esta fase. La preferencia de nuestro grupo fue utilizar el extremo distal para la anastomosis, ligando por tanto el extremo proximal.

Operación de trasplante multivisceral modificado: implante heterotópico con anastomosis arterial a la AA y anastomosis venosa a la vena cava infrarrenal. La parte inicial fue similar a la del trasplante de intestino aislado, pero algo más incómoda, ya que el mayor tamaño del injerto multivisceral modificado, y la presencia del estómago, hicieron que el injerto fuera más difícil de acomodar en el lado izquierdo del campo quirúrgico; y acortó el segmento de VP libre para realizar la anastomosis. Esta fue una de las mayores diferencias encontradas entre ambos procedimientos. Tras la revascularización del injerto, se realizó estoma distal en cuadrante inferior derecho del abdomen del animal (Figura 6 y Figura 7).

Figura 6: Fases de las anastomosis vasculares del injerto multivisceral modificado. A) Vena cava y arteria aorta abdominal clampadas. B) Anastomosis portal finalizada. C) Preparación de anastomosis arterial. D) Anastomosis arterial finalizada antes de la reperusión.

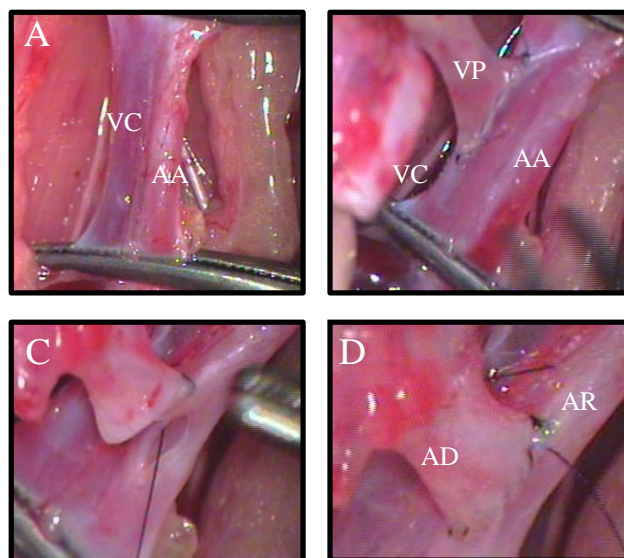
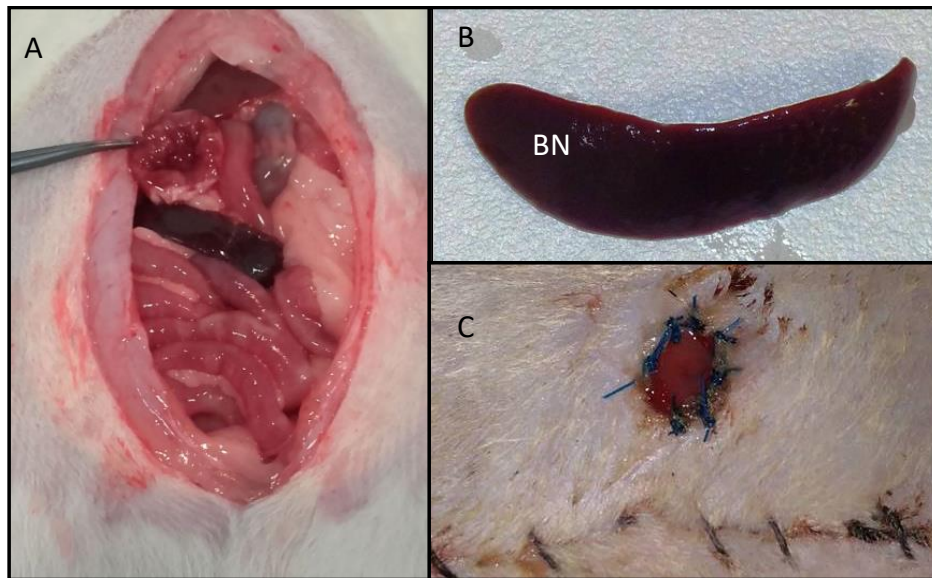


Figura 7: A) Aspecto macroscópico del injerto multivisceral modificado después de la reperfusión. Destacan en el injerto el estómago (E), el bazo (B), el páncreas (P) y el intestino delgado (ID) que presenta una coloración normal. B) Bazo nativo, extirpado en el grupo MVM-B antes del cierre. C) Estoma terminal del injerto en posición paramedial.



Sacrificio y obtención de muestras: los animales que mostraron signos de fallo del injerto en las primeras 48 horas (postura antiálgica, malestar general, anorexia, etc.) fueron sacrificados por sobredosis de anestesia. Para la obtención de muestras se realizó un procedimiento anestésico similar al descrito para las intervenciones previas, sin administración de suero. Los animales que sobrevivieron al postoperatorio inmediato, fueron sacrificados a los 14 días de la intervención.

3.3. Diseño experimental:

Grupos de estudio.

En todos los casos se emplearon ratas macho entre 250 y 300g, tratando siempre de que el peso de la donante fuera menor que el de los receptores. Se utilizó la cepa Lewis como donante y Brown Norway como receptora. Se asignaron los animales, de manera aleatoria, uno de los siguientes grupos:

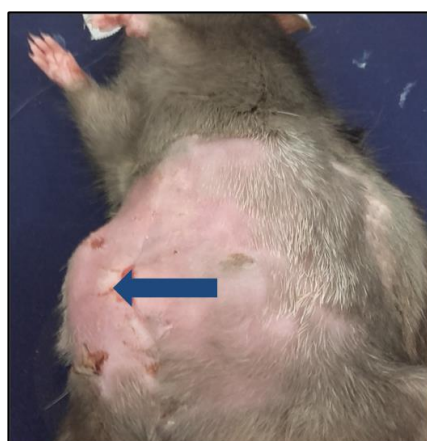
- TIA, trasplante de intestino aislado.

- MVM+PB trasplante multivisceral modificado con preservación del bazo nativo.
- MVM-B, trasplante multivisceral modificado y esplenectomía de bazo nativo.

Seguimiento postquirúrgico.

Tras el procedimiento de trasplante, los animales fueron estrictamente controlados de manera periódica con el fin de garantizar su bienestar. Durante la revisión de los receptores se tuvieron en cuenta diferentes parámetros y signos clínicos con el objetivo de identificar y tratar dolor o las molestias, como también aquellas manifestaciones que pudieran indicar la presencia de rechazo del injerto o EICH. El seguimiento del injerto se realizó principalmente a través de la palpación y la observación de la coloración de la mucosa del intestino trasplantado. Se conoce que la manifestación clínica más representativa es el endurecimiento del injerto, el cual se puede apreciar mediante palpación abdominal del animal receptor e incluso, en casos extremos, este endurecimiento del injerto se puede visualizar fácilmente en la región abdominal derecha (Figura 8).

Figura 8: Animal de la cepa Brown Norway receptor de un trasplante alogénico a los 10 días pos-quirúrgicos. En la imagen se observa claramente un abultamiento en la región abdominal derecha del animal ocasionada por un endurecimiento severo del injerto, indicativo de rechazo.

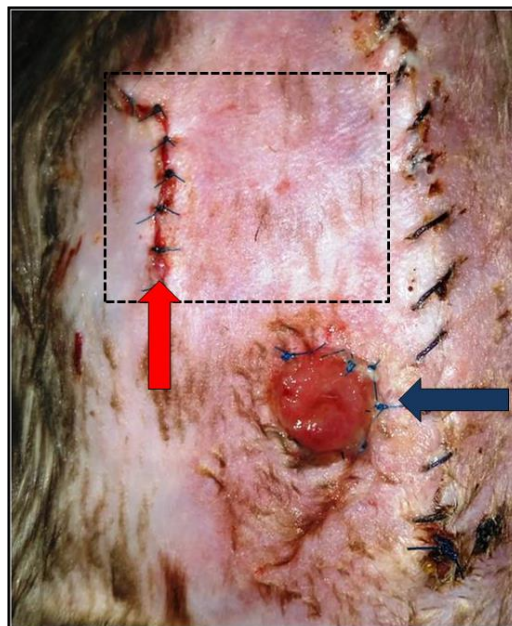


Toma de muestras

Para la realización de estudios complementarios, se obtuvieron muestras de sangre a los 3, 7 días pos-Tx y al momento de sacrificio de los receptores. Considerando la importancia de las manifestaciones cutáneas en lo que respecta a la EICH, se obtuvieron muestras de piel abdominal y pabellón auricular a los 7 días postrasplante (Figura 9).

Al momento del sacrificio de las ratas receptoras, se tomaron muestras del injerto (intestino, estómago, páncreas y bazo) y de órganos nativos (intestino, estómago, bazo, piel, hígado y pulmón). Las muestras fueron fijadas en formol neutro al 10% para su posterior estudio histopatológico.

Figura 9: Ejemplo de toma de muestras 7 días postrasplante alogénico. En la imagen se observa el área con erupción cutánea (recuadro) de donde se obtuvo una muestra de piel (flecha roja) para el estudio histopatológico. Por otro lado, se aprecia una correcta coloración de la mucosa del intestino trasplantado (flecha azul).



3.4. Variables analizadas

3.4.1. Supervivencia.

Se analizó la supervivencia después del procedimiento en cada uno de los grupos. Este dato fue observado con gran interés por tratarse de un nuevo modelo, así como el momento en el que aparecieron las complicaciones, que no habían sido descritas hasta la fecha.

3.4.2. Estudios funcionales

3.4.2.1. Prueba de absorción de glucosa.

Con el objetivo de evaluar la capacidad funcional del intestino trasplantado, se realizaron pruebas de absorción de glucosa en animales receptores entre los 7 y 10 días pos-TxMVM utilizando solución de glucosa (0,4 gr/ml) a una dosis de 2 gr/Kg.

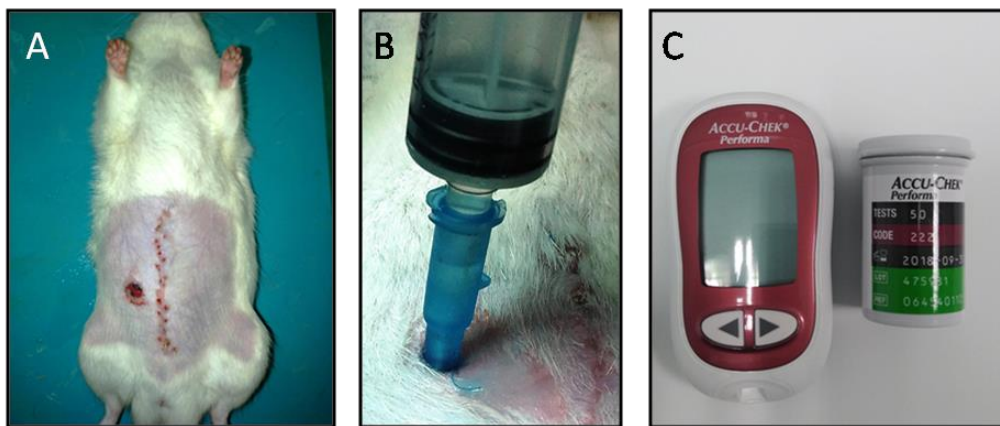
Para realizar este procedimiento, los animales fueron anestesiados con Isoflurano (5 % para inducción y 1-1,5 % para mantenimiento) y colocados en posición decúbito dorsal. Luego de 20 minutos de estabilización, se realizó una medición de glucemia basal obteniendo la muestra por punción de la vena de la cola con una aguja 25G. Una vez obtenido este valor, se procedió a administrar la solución glucosada a través de la ostomía del injerto, utilizando una jeringa y un catéter N° 22 o 24, como se aprecia en la ilustración 7. Se realizaron mediciones de glucemia a los 15, 30 y 60 minutos pos-administración de la solución glucosada. En caso de ser necesario, se llevaron a cabo mediciones adicionales cada 30 minutos hasta que los valores volvieron a ser similares al basal (Figura 10).

3.4.2.2 Función hepática y renal.

Se evaluó la funcionalidad hepática y renal mediante espectrofotometría utilizando un Analizador Dimension Vista® System (SIEMENS). Se realizaron mediciones de Urea (Método cinético ureasa/glutamato deshidrogenasa),

Creatinina (Método cinético Jaffé modificado. Picrato alcalino) y enzimas hepáticas ALT y AS a través de métodos enzimáticos en presencia de piridoxal fosfato.

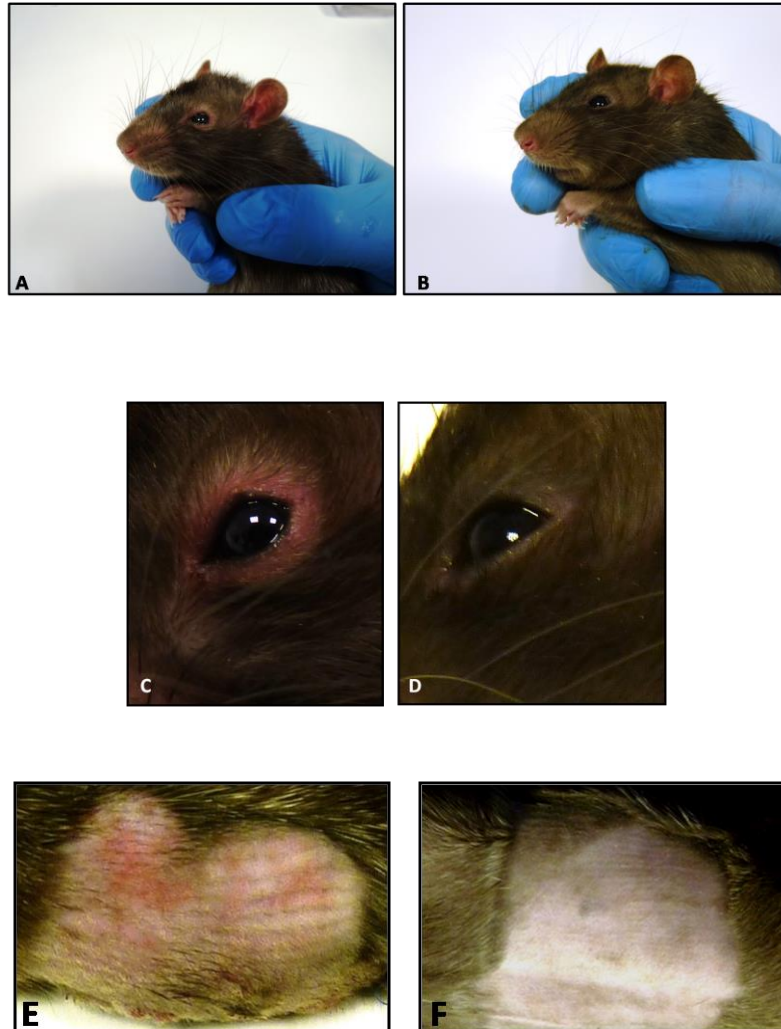
Figura 10: Imágenes representativas del test de absorción de glucosa en ratas trasplantadas. Se observa la ostomía (A) por donde se administra la solución glucosada (B). Los valores de glucemia se obtuvieron mediante la utilización del sistema de medición de glucemia Accu-Chek (Roche) (C).



3.4.3. Valoración clínica de EICH.

En el caso del EICH, se vigiló especialmente la aparición de erupción cutánea, como signo más típico de dicha enfermedad. La erupción suele observarse en la piel de los pabellones auriculares, hocico, región periocular y piel abdominal (Figura 11). Se diagnosticó EICH cuando apareció pérdida de peso, erupción cutánea, caída de pelo o postura antiálgica.

Figura 11: A) Signos marcados de erupción cutánea en región periocular, nasal y pabellón auricular de un animal de la cepa Brown Norway. C) Detalle de erupción cutánea en región periocular. E) Erupción cutánea en piel de región abdominal. Las figuras B, D y F corresponden a animales control (sin ningún tipo de intervención).



3.4.4. Citometría de flujo:

Dada la importancia del quimerismo en la aparición de la EICH, y también probablemente en el fenómeno inverso, el rechazo del órgano (reacción huésped contra injerto), se realizó citometría de flujo para determinar el porcentaje de células del donante circulantes en sangre periférica del receptor.

Se conoce que las ratas de la cepa Lewis presentan haplotipo MHC RT1. Mientras que las ratas de las ratas Brown Norway presentan MHC RT1 (n) ⁴⁰. Por su parte, el anticuerpo B5, identificado por Smith et al ^{41,42} reacciona de forma

específica con el epítipo S del antígeno MHC clase I de rata, haplotipos RT1 [a, b, l]. Por tanto, se puede identificar las células de la cepa donadora Lewis en sangre periférica de la rata receptora, Brown Norway, realizando un marcaje de mediante el anticuerpo B5 y posterior análisis mediante citometría de flujo.

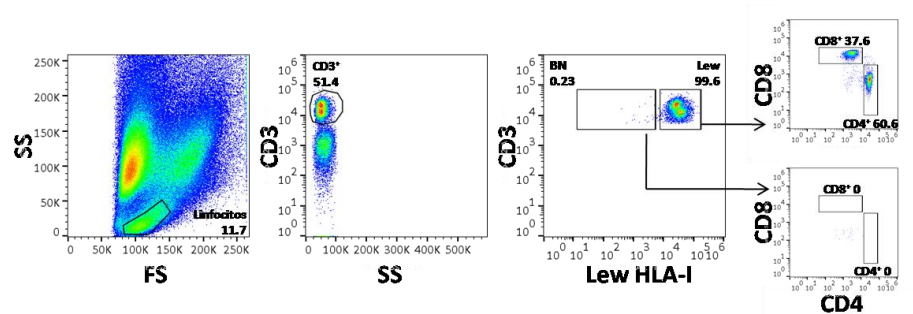
Antes del trasplante, realizamos el marcaje de células de sangre periférica de ratas Lewis y Brown Norway, empleando además del anticuerpo B5, anticuerpos anti CD3, anti CD4 y anti CD8 (**¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.**). Comprobamos que el 99,6% de las células Lewis CD3+, efectivamente se marcaron con el anticuerpo B5. Además, identificamos un 37,8% de las mismas como CD8+ y un 60,6% como CD4+. Por su parte, en la cepa Brown Norway, el 97,8% de las células CD3+ no se marcaron con B5. De ellas, el 10,6% resultaron CD8+ y un 83,9% CD4+. De acuerdo con la bibliografía, las ratas BN tienen la misma cantidad de células T CD4, pero tres veces menos células T CD8 que las ratas LEW ⁴³. Estos resultados nos permitieron constatar que podíamos emplear esta combinación de anticuerpos y el análisis mediante citometría de flujo para realizar el seguimiento del quimerismo postrasplante.

Se realizaron determinaciones en los días de postoperatorio 3, 7 y 10. Las muestras de sangre se recolectaron en tubos BD Vacutainer con EDTA. Se lisaron los eritrocitos mediante cloruro de amonio. Por cada 100 µl de sangre a analizar se añadieron 2 ml de cloruro de amonio 0,85 % p/v previamente filtrado por 0,22 µ y se incubó durante 10 min a temperatura ambiente. A continuación, se centrifugó (600 g, 10 min) y se descartó el sobrenadante. El pellet de células resultantes se resuspendió en PBS y se añadió el panel de anticuerpos marcados que se muestra en la tabla 1. Tras una incubación de 30 min a 4°C, las células se analizaron en un citómetro Beckman Coulter Navios y el programa FlowJo v10.

Gráfica 1: Tinción con el anticuerpo anti MHC RT1 [a,b,I], anti CD3, anti CD4 y anti CD8 de sangre periférica de ratas Lewis y Brown Norway. Se muestra un histograma de tamaño y complejidad sobre el que selecciona la población linfocitaria. Sobre ésta, se selección Tinción con el anticuerpo, se selecciona la población CD3+. Se muestra el porcentaje de células CD4+ y CD8+ dentro de las poblaciones MHC RT1 [a,b,I]+ (células Lewis) y MHC RT1 [a,b,I]- (células Brown Norway).

Análisis Pre-Trasplante

Cepa Lewis



Cepa Brown Norway

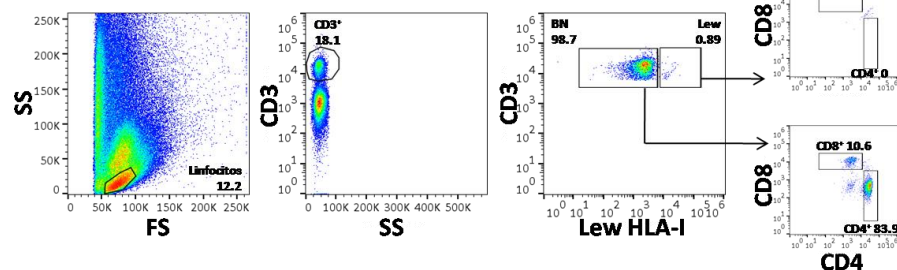


Tabla 1: Panel de anticuerpos marcados determinados mediante citometría de flujo.

Antígeno	Especie	Fluorocromo	Isotipo	Clon	Casa comercial
CD3	Rata	PE	IgG3	G4.18	BD Bioscience
CD4	Rata	APC	IgG2a	OX-35	eBioscience
CD8	Rata	PECy7	IgG1	OX-8	eBioscience
RT1(a,b,I)	Rata	FITC	IgM	B5	BD Bioscience

3.4.5. Producción de citoquinas en sobrenadante de cultivo:

Las muestras de sangre se recolectaron en tubos BD Vacutainer con EDTA. Se extrajo el plasma tras la centrifugación a 600 g durante 10 min y se almacenó a -80°C. Para la determinación de IL-2, TNF e IFN- γ se utilizó el kit Flex Set (BD Bioscience), siguiendo las instrucciones del fabricante (BD).

Las muestras de plasma (50 μ l) se incubaron con las bolas de captura de las citoquinas indicadas durante una hora a temperatura ambiente. A continuación, se añadieron los reactivos de detección específicos para cada citoquina acoplados al fluorocromo PE y se incubó durante dos horas más, a temperatura ambiente y carente de luz. Transcurrida la incubación, se realizó un lavado añadiendo 500 μ l de PBS* con 0,5% albúmina de suero bovino (BSA; Sigma-Aldrich). Se centrifugó (600 g, 10 min), se descartó el sobrenadante y se resuspendió el pellet en 150 μ l de PBS-BSA 0,5%. Las muestras se analizaron en un citómetro Beckman Coulter Navios y el programa FCAP Array v.1.0.1. Para la cuantificación de cada citoquina se elaboró una curva patrón con concentraciones conocidas de las mismas. Los límites técnicos de detección fueron: 0,46 pg/mL (IL-2), 27,7 pg/mL (TNF) y 6,8 pg/mL (IFN- γ).

3.4.6. Histología:

Las muestras extraídas fueron fijadas en formalina tamponada al 4%, embebidos en parafina y seccionados a 5 μ m. Se realizaron tinciones con hematoxilina-eosina para histología convencional y estudio de rechazo e injerto contra huésped. El rechazo fue interpretado de acuerdo con la clasificación clínica de cinco grados usada en la clínica de forma habitual (Tabla 2). La EICH intestinal fue evaluada de acuerdo con la clasificación internacional que establece grados de I a IV (Tabla 3). Finalmente, la EICH cutánea fue evaluada según la clasificación de grados de I a IV (Tabla 4).

PBS: tampón fosfato salino (1 mM KH₂PO₄, 10 mM Na₂HPO₄, 137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, pH 7)

Tabla 2: Niveles de rechazo celular agudo en trasplante de intestino humano, consensado durante la reunión de trabajo de patología del *VIIIth international Small Bowel Transplant Symposium*, Miami, Florida, 2003⁴⁴.

Grado	Hallazgos histológicos
Grado 0:	no evidencia de rechazo
Grado indeterminado:	Infiltrado mínimo o localizado, apoptosis <6/10 criptas
Grado 1 (leve):	Infiltrado leve, daño en criptas leve, apoptosis >6/10 criptas
Grado 2 (moderado):	Infiltrado y daño en criptas mayor, apoptosis confluyente , daño estructural
Grado 3 (grave):	Infiltrado y daño en criptas difuso con apoptosis focal confluyente, y ulceración.

Tabla 3: Clasificación histológica de la EICH intestinal.

Grado	Hallazgos histológicos
I	Apoptosis de células epiteliales de las criptas, mínimo infiltrado linfocitario
II	Grado I+ abscesos cristalinos, puede existir infiltrado PMN y eosinófilos
III	Grado II+ desaparición focal o difusa de las criptas
IV	Denudación de la mucosa

EICH: enfermedad de injerto contra huésped; PMN: polimorfonucleares neutrófilos.

Tabla 4: Estadios de EICH cutánea según criterios histopatológicos en biopsia de piel humana.

Grado	Hallazgos histopatológicos
Grado I	Vacuolización epidérmica basal
Grado II	Infiltración mononuclear epidérmica y degeneración de membrana basal
Grado III	Formación de bullas
Grado IV	Ulceración

EICH: enfermedad de injerto contra huésped.

3.5. Estadística:

Los resultados se expresaron en media \pm DS, se compararán usando el test-t de Student, ANOVA y test de comparaciones repetidas de Tukey cuando fue pertinente. Las curvas de supervivencia se compararon con el test log-Rank. Para las variables categóricas se utilizó el test X^2 . Se consideraron significativos valores de $P < 0.05$.

RESULTADOS

4. RESULTADOS

4.1. Estudio clínico.

Se incluyó el bazo en 11,7% de los pacientes, se preservó el bazo nativo en el 50,5%, y se realizó esplenectomía en el 37,8%. En los pacientes que preservaron el bazo se observó una frecuencia mayor de rechazo; presentaron rechazo humoral el 4%, rechazo crónico con una frecuencia 4 veces superior, rechazo celular agudo con una frecuencia dos veces mayor que los pacientes esplenectomizados. Ninguno de los pacientes en los que se incluyó el bazo en el injerto presentaron rechazo humoral ni rechazo crónico; el síndrome linfoproliferativo postrasplante también fue 1,8 veces mayor en este grupo.

En la tabla 3, se muestran los porcentajes de EICH que presentaron los pacientes trasplantados divididos en las siguientes categorías: bazo trasplantado, esplenectomía, y preservación de bazo nativo. Como puede observarse, el porcentaje de EICH fue mayor en los pacientes en los que se trasplantó el bazo, menor en aquellos en los que simplemente se practicó esplenectomía, y menor aun en el grupo en el que se preservó el bazo. No obstante, las diferencias, considerando de forma aislada la presentación de EICH, no fueron estadísticamente significativas ($p>0.05$).

Tabla 5: Tabla de contingencia de EICH en pacientes agrupados en función de la presencia o no de bazo tanto nativo como trasplantado.

	EICH	No EICH	TOTAL	% EICH
Bazo trasplantado	4	8	12	33,3
Esplenectomía	6	33	39	15,3
Preservación bazo nativo	4	48	52	7,6
TOTAL	14	89	103	

En la Tabla 6, se muestran los porcentajes de pacientes que presentaron anemia hemolítica postrasplante, al igual que en la comparación anterior, considerando la anemia hemolítica como fenómeno aislado, los pacientes que preservaron el bazo nativo presentaron menor incidencia de anemia hemolítica, aunque la diferencia no alcanzó significación estadística.

Tabla 6: Tabla de contingencia de anemia hemolítica postrasplante en pacientes que recibieron un injerto intestinal agrupados por la presencia o no de bazo nativo y trasplantado.

	Anem hemol	No Anem Hemol	TOTAL	% An Hemol
Bazo trasplantado	4	8	12	33,3
Esplenectomía	6	33	39	15,3
Preservación bazo nativo	4	48	52	7,6
TOTAL	14	89	103	

An Hem: Anemia hemolítica postrasplante.

Test Chi cuadrado, $p < 0,05$.

Sin embargo, como se muestra en la Tabla 7, si se combinan los pacientes que tuvieron EICH o alteraciones hematológicas, consideradas en este contexto una forma menor de EICH; La presentación de anemia hemolítica o EICH en pacientes en los que se preservó el bazo nativo fue significativamente menor (test Chi cuadrado, $p < 0,05$). En la misma tabla, se observa que la mortalidad también fue significativamente menor en los pacientes en los que se preservó el bazo (test Chi cuadrado, $p < 0,05$)

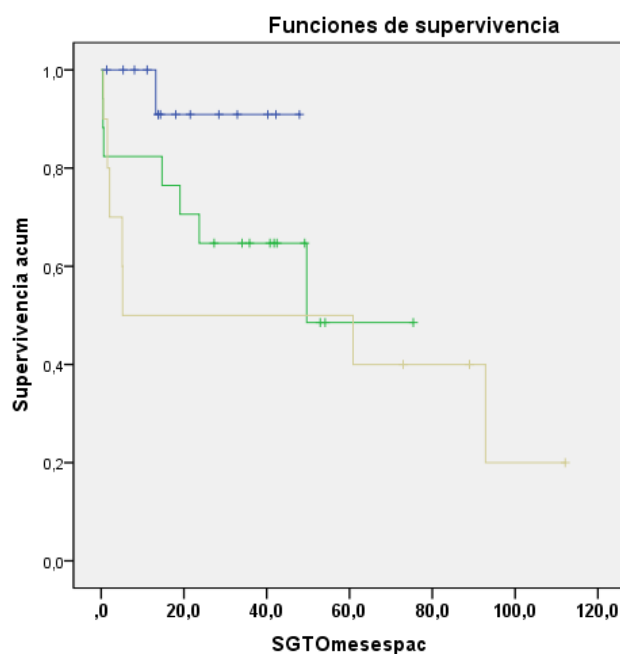
Tabla 7: Porcentaje de EICH o anemia hemolítica y mortalidad en pacientes que recibieron un injerto intestinal agrupados según la presencia o no del bazo nativo y trasplantado.

	EICH o An Hem (%)	Mortalidad (%)
Bazo trasplantado	33,3	66
Esplenectomía	18	51
Preservación bazo nativo	7,6*	17*
TOTAL		

An Hem: Anemia hemolítica postrasplante.

Test Chi cuadrado, $p < 0,05$.

Figura 12: Gráfica comparativa de supervivencia acumulada en pacientes en los que se preservó el bazo nativo en comparación con los que fueron esplenectomizados, y con aquellos en los que se incluyó el bazo alogénico en el injerto (test log-Rank: $p < 0,05$)



4.2. Modelo experimental

4.2.1. Seguimiento clínico y supervivencia

Los receptores de los grupos MVM ISO-B y MVM ISO+PB, alcanzaron supervivencia prolongada sin ningún tipo de complicaciones, y ninguno mostró signos de rechazo del injerto o EICH; como era de esperar, considerando la combinación de cepas⁴⁵.

Grupo alogénico MVM-B: en un receptor de este grupo se realizó eutanasia y toma de muestras a los 3 DPT por presentar signos compatibles con respuesta inflamatoria sistémica. Otro animal fue sacrificado y muestreado a los 7 DPT por presentar erupción cutánea generalizada sumado a pérdida de peso y piloerección. En los receptores restantes de este grupo, se realizó la eutanasia y muestreo entre los 7 y 10 DPT. Al momento de la toma de muestras, se pudo apreciar de manera macroscópica signos compatibles con rechazo en el injerto trasplantado

Grupo alogénico MVM+PB: en 2/5 de los receptores de este grupo se realizó eutanasia y muestreo en el 10 DPT, tras presentar erupción cutánea; los 3/5 restantes fueron sacrificados a los 7 (1/3), 8 (1/3) y 10 (1/3) DPT, al observar signos de rechazo

Gráfica 2: A- las curvas representan el momento de sacrificio y muestreo de los receptores alotéricos con y sin preservación de bazo. Los receptores isogénicos presentaron una excelente supervivencia prolongada pos-trasplante. Figura B: La clínica de EICH (rash cutáneo) se presentó con mayor frecuencia en el grupo de ratas esplenectomizadas (4/4 vs 2/5, test Chi cuadrado, $p < 0,05$), y los signos de rechazo fueron menores en dicho grupo (0/4 vs 3/5, test Chi cuadrado, $p < 0,05$)

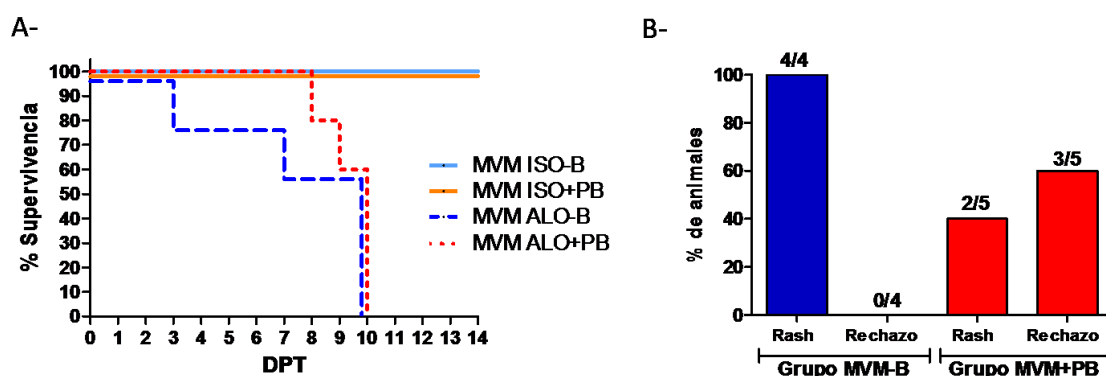
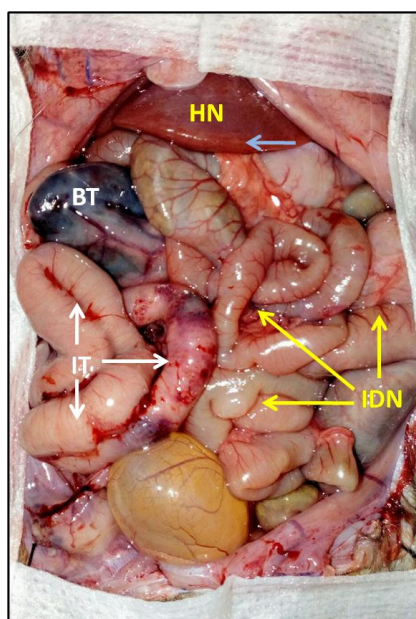


Figura 13: Imagen de la cavidad abdominal de un receptor de TxMVM alotérico sin tratamiento IS a los 10 días postrasplante. Se aprecia una marcada esplenomegalia del bazo trasplantado (BT) y signos macroscópicos de rechazo en el intestino trasplantado (IT). En cuanto a los órganos nativos del receptor, no se observan alteraciones en el intestino delgado nativo (IDN). Sin embargo, se aprecia hepatomegalia con la característica presencia de bordes redondeados (flecha celeste).



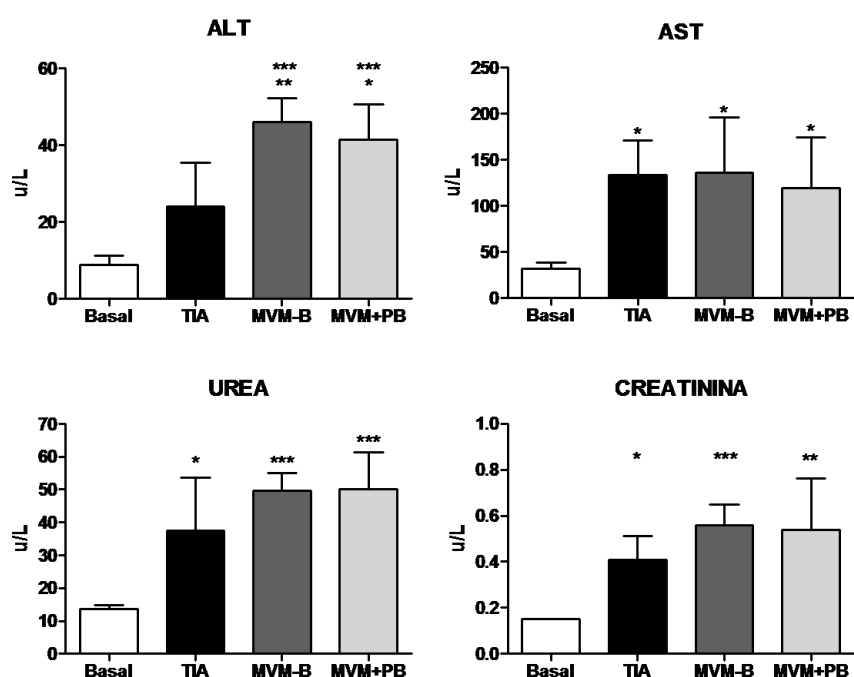
4.2.2. Estudios de funcionales.

a) Función hepática y renal.

Se realizaron estudios de laboratorio para determinar la funcionalidad hepática y renal de los animales receptores a los 7 días postrasplante. En lo referente a las enzimas hepáticas, los grupos con MVM con y sin preservación de bazo mostraron los niveles más elevados de ALT, arrojando diferencias estadísticamente significativas en comparación con los valores basales y los animales receptores de TIA. En cuanto a la AST, los 3 grupos de trasplante (TIA, MVM-B y MVM+PB) mostraron un aumento considerable de esta enzima en comparación con el grupo basal. Respecto a la función renal, tanto la urea como la creatinina aumentaron significativamente respecto a los valores basales en los grupos con TIA y MVM (Gráfica 3).

Gráfica 3: representación “box plot” comparativa de parámetros de función hepática y renal en ratas receptoras de TIA (trasplante de intestino aislado) MVM-B (trasplante multivisceral modificado con esplenectomía) y MVM+PB (trasplante multivisceral modificado con preservación de bazo nativo).

* $p < 0,5$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

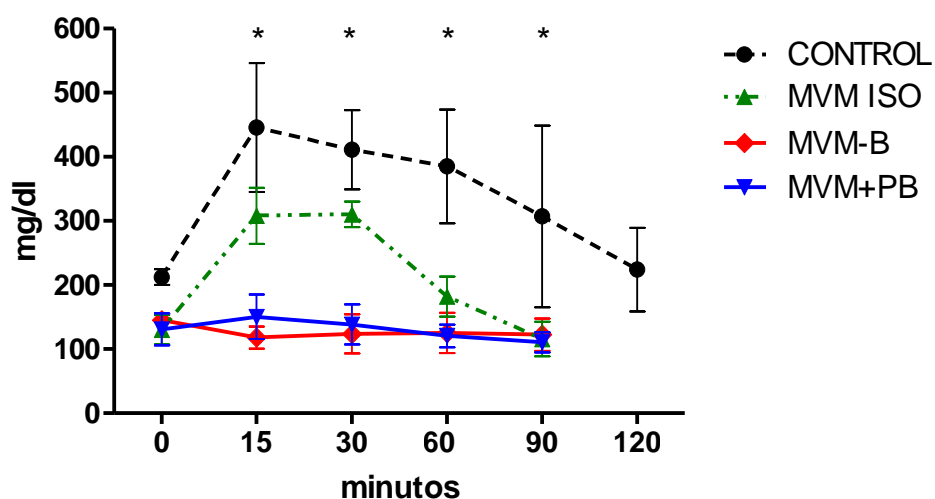


3.5.1.1. Absorción intestinal.

Como se observa en la Gráfica 4, las curvas realizadas en animales control y receptores de MVM isogénico muestran una cinética característica en lo que respecta a la absorción de glucosa, alcanzando un pico máximo a los 15-30 minutos luego de su administración intraluminal, para ir disminuyendo entre los 60 y 120 minutos, retornando a niveles de glucemia basal.

La absorción de glucosa se vio alterada en los injertos alogénicos de los grupos MVM-B y MVM+PB. Tal como se muestra en la curva, los niveles de glucemia en estos receptores se mantuvieron constantes durante todo el estudio, siendo inferiores a los 15, 30, 60 y 90 minutos pos-administración de glucosa en comparación con curvas realizadas en animales control y receptores de TxMVM isogénicos ($p<0.05$).

Gráfica 4: Curvas de glucemia tras la administración de glucosa intraluminal a través del estoma del injerto intestinal en los grupos: control, trasplante multivisceral modificado isogénico (MVM ISO), trasplante multivisceral modificado con esplenectomía (MVM-B) y trasplante multivisceral modificado con preservación de bazo nativo (MVM+PB). * $p<0,05$.

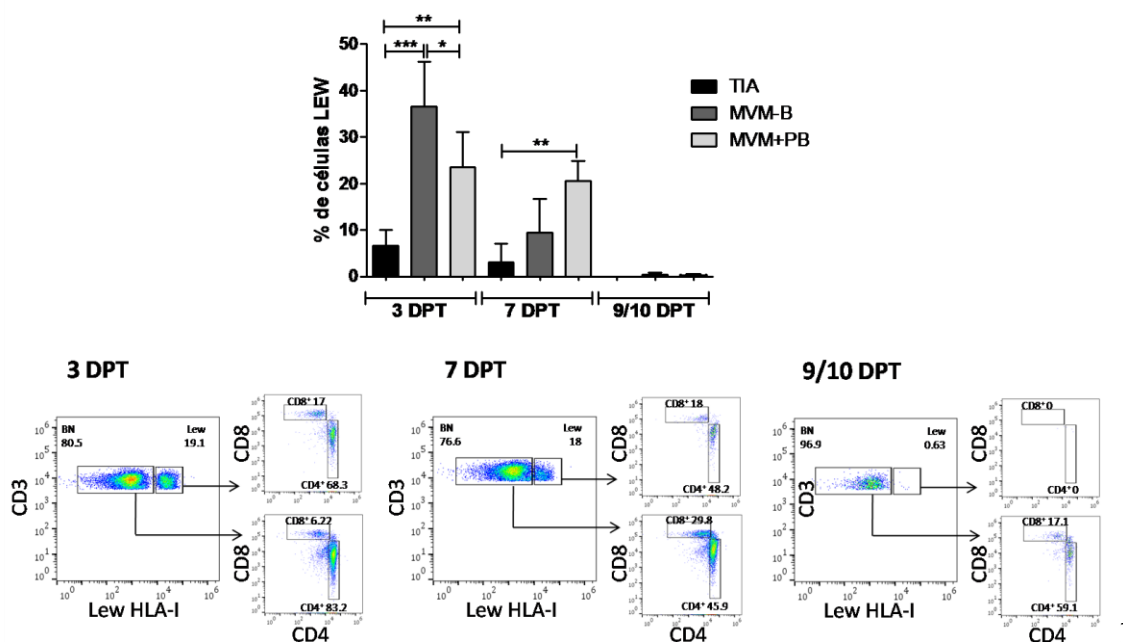


4.2.3. Citometría de flujo:

Analizamos sangre periférica de ratas trasplantadas a día 3, 7 y 9-10 post trasplante (.

Gráfica 5). Observamos un pico de quimerismo a día 3 post trasplante, el cual se va reduciendo hasta prácticamente desaparecer a día 9-10. Las ratas receptoras de injerto intestinal alcanzaron un quimerismo máximo de $7\% \pm 3\%$ células de la rata donadora Lewis. En el caso de receptoras de injerto multivisceral, el quimerismo máximo fue de $35\% \pm 10\%$, reduciéndose a $22\% \pm 8\%$ en caso de preservación del bazo nativo ($p < 0,05$). La preservación del bazo nativo, asimismo, dio lugar a una pérdida más lenta de las células T del injerto en los sucesivos días post trasplante. La ratio CD4:CD8 de la cepa Lewis en condiciones pretrasplante se encuentra en torno a 1,5. En sangre periférica de ratas Brown Norway receptoras, dicho ratio se vio incrementado hasta valores entre 2,5-4 (Gráfica 6).

Gráfica 5: Análisis mediante citometría de flujo del porcentaje de células T Lewis MHC RT1 [a,b,l]+ en sangre periférica de ratas receptoras Brown Norway a diferentes días postrasplante en los grupos TIA, MVM-B y MVM+PBN. Se muestra el porcentaje de células CD4+ y CD8+ dentro de las poblaciones MHC RT1 [a,b,l]+ (células Lewis) y MHC RT1 [a,b,l]- (células

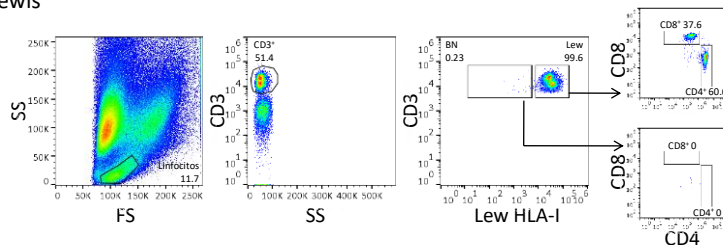


Brown Norway) $*p<0,05$; $**p<0,01$; $***p<0,001$.

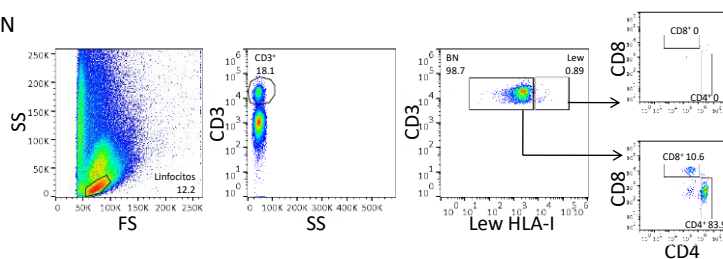
Gráfica 6: Tinción con el anticuerpo anti MHC RT1 [a,b,l] anti CD3, anti CD4 y anti CD8 de sangre periférica de ratas Lewis y Brown Norway. Se muestra un histograma de tamaño y complejidad sobre el que se selecciona la población linfocitaria. Sobre esta, se selecciona la población de CD3+. Se muestra el porcentaje de células CD4+ y CD8+ dentro de las poblaciones MHC RT1 [a,b,l]+ (células Lewis) y MHC RT1 [a,b,l]- (células Brown Norway)

Lew y BN pretrasplante

Lewis



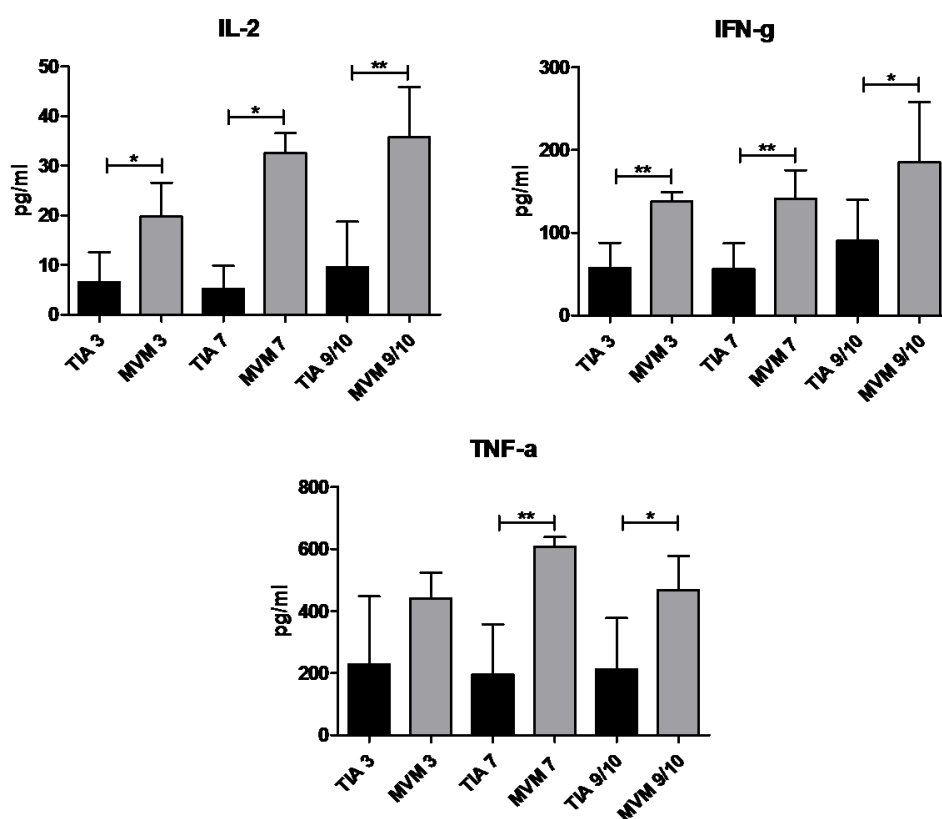
BN



3.5.2. Producción de citoquinas en sobrenadante de cultivo:

Las citoquinas proinflamatorias IL-2, IFN- γ y TNF- α mostraron niveles mayores en las ratas receptoras de injerto MVM en los días 3, 7 y 10 postrasplante, en comparación con las receptoras de TIA muestreadas en momentos equivalentes (Gráfica 7)

Gráfica 7: Gráfico de barras representando los niveles de IL-2, IFN-g y TNF-a en ratas receptoras de trasplante de intestino aislado (TIA) y trasplante multivisceral modificado (MVM) los días 3, 7 y 9-10.



3.5.3. Histología:

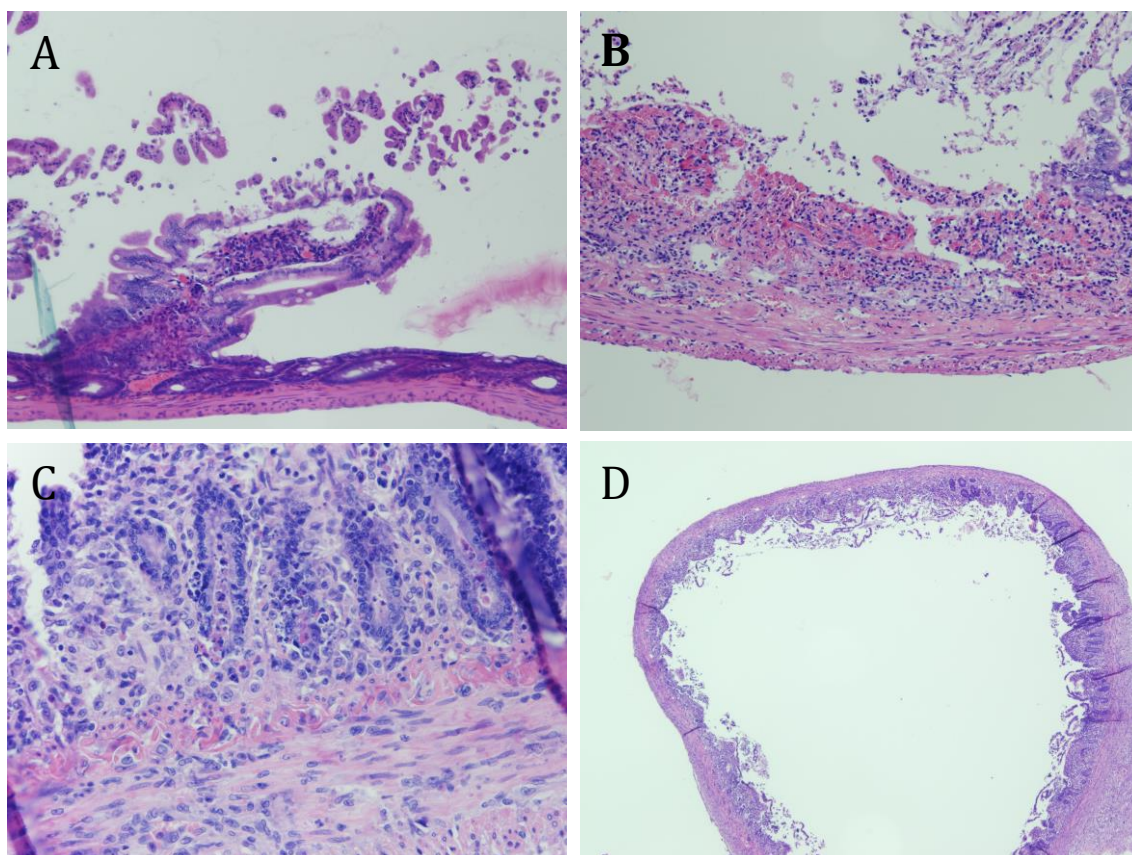
En análisis patológico realizado sobre los intestinos nativos de los receptores alogénicos de MVM se observaron signos compatibles con EICH. En ambos grupos, con y sin preservación de bazo nativo, el porcentaje de injertos con

estos signos fue del 60 %. En la Figura 14 (A y B), se muestran a manera de ejemplo el aspecto microscópico de intestinos nativos con presencia de EICH.

Respecto a los intestinos trasplantados, en donde se realizó el análisis en busca de manifestaciones compatibles con rechazo, se evidenció presencia de este fenómeno en el 100 % de los intestinos analizados (Figura 14C y D). Las observaciones llevadas a cabo sobre la piel del abdomen y orejas de los receptores arrojaron escasa evidencia de presencia de EICH en el análisis realizado mediante microscopía óptica. En ambos grupos, solo un 20% mostró signos compatibles con este fenómeno.

Al realizar los análisis estadísticos correspondientes por grado de rechazo o EICH, no se observaron diferencias estadísticamente significativas entre grupos.

Figura 14: Fotografías realizadas con 4,20 y 40X, de muestras de intestino trasplantado después de 10 días, tinción con HE. A) EICH grado III (20x), B) EICH grado IV (40x), C) Rechazo moderado con apoptosis confluyente (40x), D) Rechazo agudo celular grave.

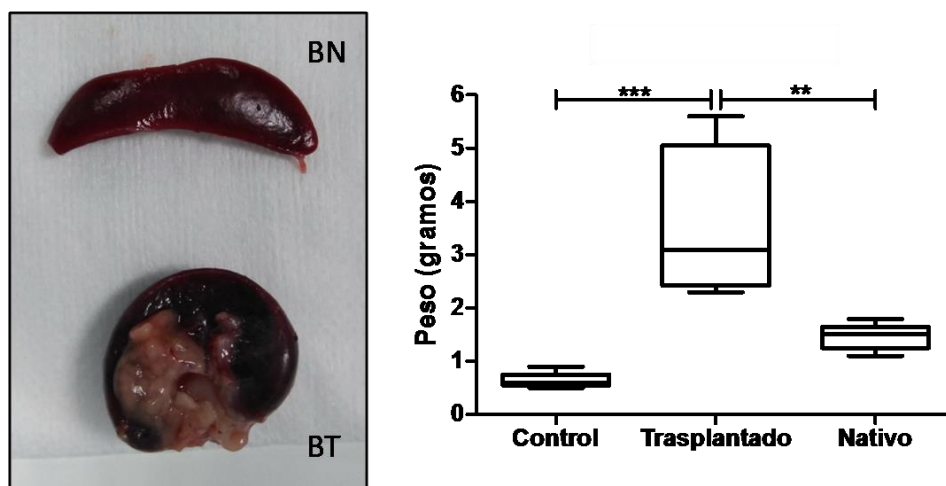


EICH: enfermedad de injerto contra huésped.

a) Peso del bazo trasplantado.

En lo referente al aspecto macroscópico de los bazos que conformaron el injerto y los bazos nativos de los receptores, se observó una esplenomegalia notoria en los bazos trasplantados (Ilustración 8), mientras que en los bazos nativos de los receptores no se observaron alteraciones a simple vista. Al pesar los órganos al momento del muestreo, los pesos promedio del bazo trasplantado y del bazo nativo del animal receptor fueron de $3,5 \pm 1,25$ y $1,46 \pm 0,2$ gramos respectivamente. Por otro lado, se obtuvieron valores de animales control (sin ningún tipo de procedimiento) donde el peso promedio del bazo fue de $0,65 \pm 0,15$. Se observaron diferencias estadísticamente significativas entre el peso de los bazos trasplantados vs el peso de los bazos nativos de los receptores ($p < 0,01$) y entre los bazos trasplantados vs los controles ($p < 0,001$) (Figura 15)

Figura 15: En la imagen de la izquierda, se observa el bazo nativo (BN) del animal receptor de trasplante MVM+PB(superior) y el bazo del injerto (Lew) (inferior). En el gráfico boxplot de la derecha se representan los pesos de los bazos trasplantados, nativos y controles (** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; Test ANOVA+Tukey).



DISCUSIÓN

VIII. DISCUSIÓN

Esta tesis doctoral recoge el desarrollo de un nuevo modelo experimental, el trasplante multivisceral modificado heterotópico, que se ha desarrollado para dar respuesta a uno de los mayores problemas identificados en la clínica, la EICH. Se trata de una complicación muy conocida en el terreno del trasplante de médula ósea, pero anecdótico en el resto de los trasplantes de órgano sólido. Tal vez por este motivo su reconocimiento fue tardío; pasaron años tras el comienzo de los grandes programas de trasplante intestinal hasta que la comunidad científica implicada en la disciplina fue consciente de la importancia del problema^{11,12,46}. La incidencia de EICH en el trasplante intestinal es diez veces superior a la incidencia en otros trasplantes de órgano sólido (10% vs 1%). Pero más importante aun es la elevada mortalidad relacionada con este fenómeno, entre el 20 y el 72%, dependiendo de las series. En la mayoría de los casos, causa de fallecimiento se relaciona con la afectación de la médula ósea y la presentación de sepsis.

Mención especial merece la situación de pacientes con inmunodeficiencias, frecuentes en determinados niños con atresia intestinal. La inmunodeficiencia afectaría al tercer criterio de Billingham, la capacidad del huésped de eliminar los linfocitos del donante. Uno de los primeros casos publicados de EICH un receptor de trasplante intestinal fue precisamente el de un niño con inmunodeficiencia⁴⁷

La incidencia de EICH en el trasplante intestinal se ha atribuido a la gran carga linfocitaria del injerto. Esta explicación concuerda con la diferencia encontrada entre trasplante de intestino aislado y el de otros órganos sólidos, y la mayor frecuencia en los receptores de trasplante multivisceral, con o sin hígado, y los receptores de intestino aislado (10,5% vs 6,8%)⁴⁸. En el equilibrio casi imposible que representa la convivencia entre la población linfocitaria del donante y el receptor, el trasplante intestinal añade otro factor de riesgo que no suele tenerse en cuenta, la eliminación de gran parte de la carga linfoide del receptor en la extirpación de órganos previa al implante. Muchos pacientes vienen de una situación de intestino corto, en la que ya ha sido eliminada gran parte de su dotación linfoide del compartimento abdominal. En este sentido, la esplenectomía, que se realizaba de forma casi rutinaria en los primeros años del trasplante

intestinal, sobre todo en los receptores de trasplante multivisceral, añade una disminución radical en la masa linfóide del receptor.

Los partidarios de la esplenectomía argumentaban acertadamente que disminuía la incidencia de rechazo, pero pagando el elevado precio de una mayor incidencia de EICH. La preservación del bazo nativo comenzó a realizarse, por motivos técnicos, en pacientes con enfermedad de Gardner que recibieron un trasplante multivisceral modificado, ya que el bazo se conservaba en bloque con el bloque formado por hígado-estómago-duodeno-páncreas. En estos pacientes se demostró por primera vez el efecto beneficioso de la preservación del bazo nativo¹⁸. A raíz de la aparición de esta publicación y con la motivación de la elevada mortalidad identificada en nuestros pacientes, el grupo del Hospital Universitario La Paz, desarrolló las modificaciones técnicas necesarias para preservar el bazo en los candidatos a trasplante multivisceral, con la dificultad añadida de que en estos casos el bazo no se preserva en bloque sino de forma aislada, por lo que la arteria esplénica debe ser preservada y clampada durante la fase previa al implante; y la vena porta anastomosada a una vía alternativa de drenaje, toda vez que el hígado nativo ha sido extirpado. En la Figura 16, se muestran los detalles de la disección en el donante previa al implante. En la Figura 17, se describen los detalles del pedículo esplénico nativo tras el implante del injerto multivisceral.

La preservación del bazo nativo demostró en nuestra experiencia una disminución considerable de la EICH y las alteraciones hematológicas, consideradas de forma conjunta por tratarse para algunos autores, de una forma menor de EICH por afectación medular¹⁹. Los hallazgos clínicos de este estudio cambiaron radicalmente nuestros resultados, pero no aportaron una explicación satisfactoria a los mecanismos por los cuales el bazo ejerce su acción protectora. Como es sabido, el bazo tiene un papel crucial en la inmunidad adaptativa, la inmunidad innata, y la cascada del complemento. La falta de una hipótesis firme fue la que nos llevó de la clínica al laboratorio para buscar un modelo que nos ayudara a profundizar en la comprensión de la EICH y el papel protector del bazo.

Figura 16 : Disección del pedículo esplénico en receptor de trasplante multivisceral. El páncreas, el duodeno y el estómago seccionado se encuentran a la derecha de la cavidad para mejorar la exposición. El injerto de aorta ya sido colocado para la posterior anastomosis con el injerto multivisceral y se encuentra clampado.

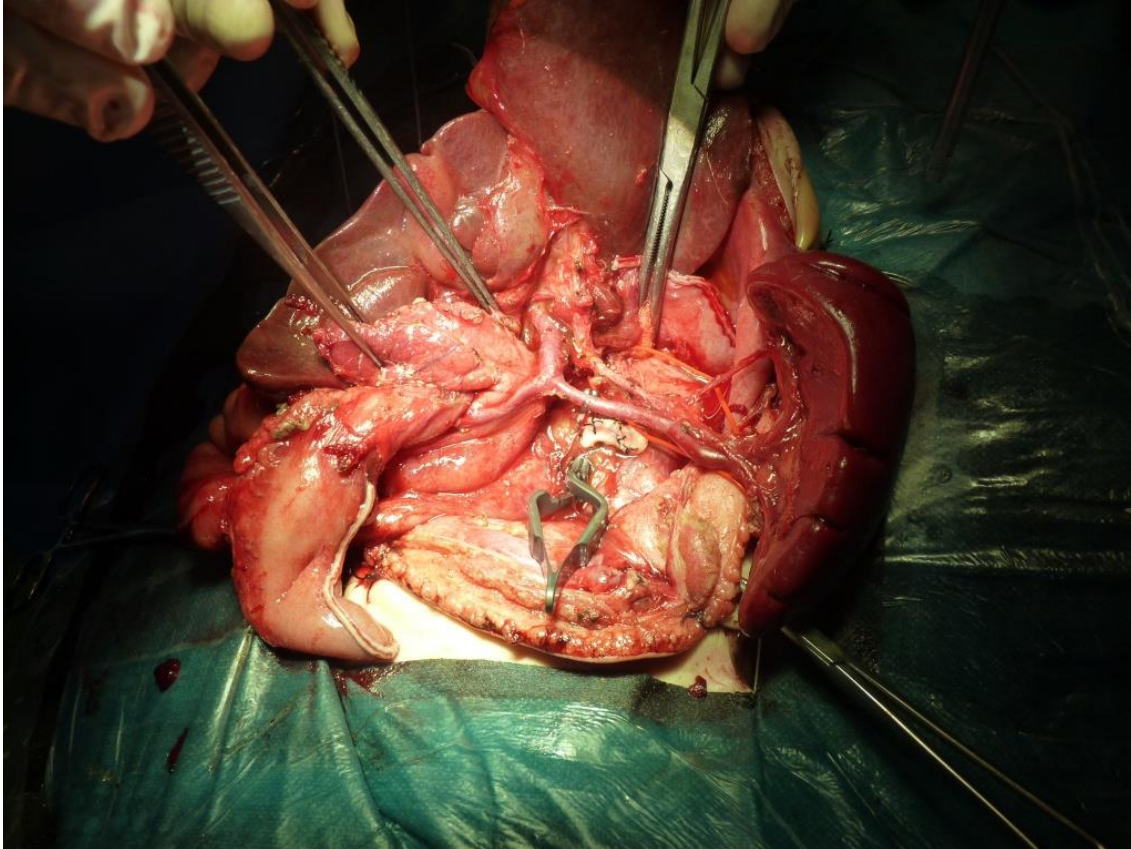


Figura 17: Detalle del pedículo esplénico nativo después del implante del injerto multivisceral en un niño. Se observa la vena porta nativa anastomosada a la vena cava inferior del injerto (se realizó implante con técnica de *piggy-back*). Inmediatamente cefálica a la vena porta se encuentra la arteria esplénica que ha sido desclampada, la pinza de la derecha de la imagen sujeta el muñón de la arteria hepática. A la izquierda de la imagen se observa la anastomosis del injerto de arteria aorta.



El camino hasta llegar a este modelo ha sido muy laborioso, como demuestran las notables modificaciones técnicas realizadas hasta conseguir una supervivencia aceptable. La experiencia del grupo en trasplante de intestino aislado era suficientemente amplia ^{31-33,49-51}, pero todos alejados de la EICH, ya que nos dedicamos nuestros estudios al rechazo, la translocación bacteriana y el preconditionamiento isquémico. La búsqueda de un modelo de EICH en ratas nos ofreció varias alternativas, pero todos se basaban en la predisposición a la EICH por la combinación genética de donante y receptor. Tratando de emplear un modelo más cercano a la clínica, basado en la carga linfóide más que en la predisposición genética, buscamos referencias de un modelo de trasplante multivisceral modificado, encontrando solo el del grupo de Galvao ⁵² que se limitó

a la observación de tres horas tras la intervención, sin demostrar supervivencia a largo plazo que validara el modelo para nuestro estudio. Tras varios experimentos, comprobamos que el modelo de trasplante multivisceral modificado ofrece una supervivencia a largo plazo similar a la observada en nuestros experimentos previos de trasplante de intestino aislado, y lo más importante, observamos en los primeros trasplantes alogénicos la aparición precoz de erupción cutánea característica de la EICH.

En lo que respecta a la supervivencia, ninguno de los receptores de trasplante alogénico sobrevivió más de 10 días, mientras que los receptores de trasplante isogénico mostraron una supervivencia del 100% a largo plazo. Una vez finalizada la curva de aprendizaje, no se observó mortalidad relacionada con la técnica quirúrgica, lo que demuestra la validez del modelo para estudiar las complicaciones inmunológicas.

Los estudios funcionales de absorción se realizaron con el objetivo de precisar el momento de la aparición del rechazo del intestino trasplantado. Estas determinaciones no son habituales en la clínica, ya que podrían alterar el metabolismo de la glucemia del paciente, sin embargo, resultaron de utilidad para determinar la presentación del rechazo antes de la evidencia clínica del mismo, ahorrando al mismo tiempo en determinaciones histológicas de escaso rendimiento. Pese a que el test de absorción de glucosa no es el adecuado para aplicar en la clínica, los resultados del presente plan de trabajo destacan la importancia de considerar la funcionalidad del injerto como marcador de rechazo o EICH. Los test de absorción, en comparación con las biopsias de injertos utilizadas actualmente en la clínica para diagnosticar problemas inmunológicos asociados al trasplante, presentan la característica de ser métodos no-invasivos, lo que representa una ventaja respecto a los métodos tradicionales.

Nuestros resultados coinciden con aquellos reportados por Stringa y col.⁵³, donde en un modelo de trasplante intestinal aislado y alogénico, observan que los intestinos trasplantados comienzan a perder su capacidad de absorción incluso antes de manifestar signos histopatológicos y niveles elevados de citoquinas pro-inflamatorias, lo que refuerza aún más los test de absorción realizados durante el presente plan de tesis.

En cuanto a la valoración clínica del EICH, resultó llamativa la precocidad con la que se presentaron las lesiones cutáneas. En la clínica, la presentación suele ser bastante tardía, con una media de tiempo entre 47 y 60 días postrasplante^{12,54}. También en la mayoría de los trabajos experimentales, la presentación se retrasa varias semanas⁵⁵. El uso de drogas inmunosupresoras habituales en el trasplante intestinal es la causa de la presentación diferida, ya que cumplen la doble función de prevención tanto del rechazo como de la EICH. En nuestro caso, la decisión de no usar inmunosupresión nos permitió observar la evolución natural de la EICH. La precocidad de la presentación unida a los datos de quimerismo, podrían ser de gran utilidad en el diseño de futuros experimentos encaminados al desarrollo de estrategias terapéuticas.

El quimerismo, la coexistencia de elementos hematopoyéticos del donante y el receptor, es uno de los temas centrales de la inmunología del trasplante. La presencia del fenómeno de quimerismo se relaciona con el llamado “linfocito pasajero”, que viaja con en el injerto⁵⁶. El microquimerismo (<1% de células del donante) es relativamente frecuente después de cualquier tipo de trasplante de órgano sólido, sobre todo en fases precoces, y se ha llegado a proponer que promueve la tolerancia del injerto. Por otro lado, el macroquimerismo (>1% de células del donante) es fundamental en el desarrollo de la EICH; de hecho, para algunos autores un quimerismo superior al 20% es muy indicativo de EICH⁵⁷; sin embargo, se han observado niveles de quimerismo tan elevados como un 30% en receptores de trasplante multivisceral, sin acompañarse de manifestaciones clínicas de EICH⁵⁴. Los linfocitos responsables del quimerismo son probablemente los de la lamina propia, o los del tejido linfoide asociado a la mucosa (GALT), con capacidad de diferenciarse únicamente en células T, sin capacidad de hematopoyesis mieloide⁵⁸. Solo los receptores en los que se incluye el hígado han mostrado en la clínica quimerismo con componente mieloide.

En nuestro trabajo, al igual que en algunos trabajos previos procedentes de la clínica⁵⁸; el trasplante MVM, con una carga linfocitaria mucho mayor que la del intestino aislado, produjo unos niveles de quimerismo significativamente superiores a los de TIA en el 3DPT. Una vez más, destaca la precocidad de los hallazgos, tan solo tres días después del trasplante. Por otro lado, la preservación del bazo nativo (MVM+PB) en el modelo multivisceral, atenuó la elevación del nivel

de quimerismo en comparación con los animales esplenectomizados que recibieron el mismo injerto (MVM-B). En el 7DPT; se observó, también como en la clínica, que la atenuación del quimerismo fue más lenta en el grupo en el que se preservó el bazo nativo; probablemente en relación con la aparición del fenómeno de rechazo, mayor en este grupo. No obstante, serían necesarios estudios más amplios de citometría para confirmar esta hipótesis. Estos hallazgos refuerzan la validez del modelo de trasplante multivisceral como herramienta para el estudio del quimerismo y la enfermedad de injerto contra huésped. Por otro lado, abre una puerta a nuevos estudios encaminados a descifrar el mecanismo por el que el bazo protege de la EICH.

Las citoquinas analizadas, IL-2, TNF e IFN- γ , mostraron valores más elevados en los receptores de trasplante MVM que en aquellos que recibieron un TIA. No obstante, dichas citoquinas carecen de especificidad para diferenciar fenómenos inflamatorios agudos como la EICH y el rechazo, por lo que sería necesario un estudio más pormenorizado para determinar el nivel de citoquinas correspondiente en cada momento a cada uno de los fenómenos referidos.

Los hallazgos de los estudios de anatomía patológica confirmaron el diagnóstico clínico, evidenciando la presentación de EICH con menor gravedad y frecuencia en el grupo MVM+PB. Se confirma, por tanto, la tercera hipótesis de este trabajo según la cual la preservación del bazo nativo en ratas receptoras de trasplante multivisceral modificado previene de la presentación de EICH. Por otro lado, sorprende relativamente la presencia de forma simultánea de rechazo y EICH en algunos animales, ya que en la clínica suele afirmarse que ambos fenómenos son dos extremos del espectro del equilibrio entre las dos líneas celulares, del donante y el receptor; y por tanto incompatibles. Una vez más, como ocurría con la precocidad en la detección de la EICH, probablemente la ausencia de inmunosupresión justifique ausencia de un periodo ventana claro entre la desaparición de la EICH y la presentación clínica del rechazo. Al margen del efecto de la inmunosupresión, la identificación simultánea de ambos fenómenos representa una gran oportunidad para la investigación de los mecanismos que determinan el paso de uno a otro.

Por encima del valor del nuevo modelo descrito en este tesis doctoral, cabe destacar el carácter clínico-experimental del trabajo realizado. La preocupación

inicial por la elevada mortalidad de una complicación tradicionalmente ajena al trasplante de órgano sólido, como es la EICH, nos llevó a desarrollar la estrategia quirúrgica de la preservación del bazo nativo en el trasplante multivisceral pediátrico. Una vez que los resultados iniciales demostraron un efecto protector del bazo nativo sobre la EICH, necesariamente surge la necesidad de un modelo experimental adecuado para el estudio de los mecanismos de este efecto beneficioso, y la falta de un modelo similar al clínico nos llevó a desarrollar el modelo mencionado, que justifica esta tesis doctoral. El modelo microquirúrgico desarrollado constituye uno de los pilares de este plan de tesis por su originalidad. Pese a que la indicación a trasplante multivisceral modificado viene aumentando en la clínica, hasta el desarrollo del presente trabajo no se han reportado modelos experimentales de este tipo de trasplante. El paso siguiente, sin duda, será la vuelta a la clínica con nuevas estrategias desarrolladas para el tratamiento o la prevención de la EICH gracias al uso de este nuevo modelo.

De la discusión de esta tesis doctoral emergen muchas más dudas que certezas. Las herramientas utilizadas en la determinación de las variables analizadas han evidenciado sus limitaciones a la hora de explicar los fenómenos observados. Y sigue sin respuesta la pregunta clínica que dio lugar a este estudio, por qué mecanismo el bazo protege de la EICH. No obstante, el modelo de trasplante intestinal en sus distintas variantes, se muestra como la mejor herramienta de investigación para avanzar en el camino hacia el anhelado “grial” del trasplante, la tolerancia, la convivencia pacífica entre las dos líneas celulares, la del donante y la del receptor.

CONCLUSIONES

IX. CONCLUSIONES

1. En los niños que recibieron un trasplante intestinal, la preservación del bazo nativo demostró mejorar la supervivencia, y disminuir la presentación de EICH y anemia hemolítica postrasplante.
2. Los estudios de función intestinal, hepática y renal, aun siendo inespecíficos, demostraron cierta utilidad en la detección precoz del rechazo y el modelo experimental.
3. La ECIH mostró manifestaciones clínicas con menor frecuencia, tanto en pacientes como en el modelo experimental, cuando se preservó el bazo nativo en comparación con los sujetos en los que se realizó esplenectomía.
4. La citometría de flujo demostró niveles de quimerismo en receptores de trasplante multivisceral modificado fueron inferiores en animales esplenectomizados en comparación con aquellos que preservaron el bazo nativo.
5. El estudio de las citoquinas IL-2, TNF e IFN- γ mostró diferencias entre los grupos de trasplante de intestino aislado y multivisceral modificado, pero careció de la especificidad necesaria para distinguir entre rechazo y EICH.
6. Los hallazgos histológicos mostraron una elevada presencia de EICH sin diferencias entre los grupos con o sin preservación de bazo nativo. Por otro lado, todos los receptores presentaron rechazo al final del experimento.
7. Los hallazgos de nuestro trabajo confirmaron la viabilidad del modelo experimental de trasplante multivisceral modificado, y su potencial como herramienta para el estudio de la EICH.

ANEXOS

ANEXO A: BIBLIOGRAFÍA

1. Vianna RM, Mangus RS. Present prospects and future perspectives of intestinal and multivisceral transplantation. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 2009; **12**(3): 281-6.
2. Lillehei RC, Goott B, Miller FA. The physiological response of the small bowel of the dog to ischemia including prolonged in vitro preservation of the bowel with successful replacement and survival. *Ann Surg* 1959; **150**: 543-60.
3. Manax WG, Bloch JH, Eyal Z, Lillehei RC. Experimental Preservation of the Small Bowel. *Am J Surg* 1965; **109**: 26-31.
4. Wilmore DW, Dudrick SJ. Growth and development of an infant receiving all nutrients exclusively by vein. *Jama* 1968; **203**(10): 860-4.
5. Lillehei RC, Idezuki Y, Feemster JA, et al. Transplantation of stomach, intestine, and pancreas: experimental and clinical observations. *Surgery* 1967; **62**(4): 721-41.
6. Grant D. Current results of intestinal transplantation. The International Intestinal Transplant Registry. *Lancet* 1996; **347**(9018): 1801-3.
7. Grant D. Intestinal transplantation: 1997 report of the international registry. Intestinal Transplant Registry. *Transplantation* 1999; **67**(7): 1061-4.
8. Grant D, Abu-Elmagd K, Mazariegos G, et al. Intestinal transplant registry report: global activity and trends. *Am J Transplant* 2015; **15**(1): 210-9.
9. Grant D, Abu-Elmagd K, Reyes J, et al. 2003 report of the intestine transplant registry: a new era has dawned. *Ann Surg* 2005; **241**(4): 607-13.
10. Billingham RE. The biology of graft-versus-host reactions. *Harvey Lect* 1966; **62**: 21-78.
11. Mazariegos GV, Abu-Elmagd K, Jaffe R, et al. Graft versus host disease in intestinal transplantation. *Am J Transplant* 2004; **4**(9): 1459-65.
12. Andres AM, Santamaria ML, Ramos E, et al. Graft-vs-host disease after small bowel transplantation in children. *J Pediatr Surg* 2010; **45**(2): 330-6; discussion 6.
13. O'Neal HR, Jr., Niven AS, Karam GH. Critical Illness in Patients With Asplenia. *Chest* 2016; **150**(6): 1394-402.
14. Rubin LG, Schaffner W. Clinical practice. Care of the asplenic patient. *N Engl J Med* 2014; **371**(4): 349-56.
15. Kato T, Mittal N, Nishida S, et al. The role of intestinal transplantation in the management of babies with extensive gut resections. *J Pediatr Surg* 2003; **38**(2): 145-9.
16. Kato T, Tzakis AG, Selvaggi G, et al. Transplantation of the spleen: effect of splenic allograft in human multivisceral transplantation. *Ann Surg* 2007; **246**(3): 436-44; discussion 45-6.
17. Abu-Elmagd KM. Preservation of the native spleen, duodenum, and pancreas in patients with multivisceral transplantation: nomenclature, dispute of origin, and proof of premise. *Transplantation* 2007; **84**(9): 1208-9; author reply 9.
18. Cruz RJ, Jr., Costa G, Bond GJ, et al. Modified multivisceral transplantation with spleen-preserving pancreaticoduodenectomy for patients with familial adenomatous polyposis "Gardner's Syndrome". *Transplantation* 2011; **91**(12): 1417-23.
19. Hernandez F, Andres AM, Encinas JL, et al. Preservation of the native spleen in multivisceral transplantation. *Pediatr Transplant* 2013; **17**(6): 556-60.

20. Stauffer UG, Becker M, Hirsig J, Meier HP, Kara O. The risks of small intestinal transplantation for the recipient: experimental results in young minipigs. *J Pediatr Surg* 1978; **13**(6): 465-7.
21. Hale DA, Waldorf KA, Kleinschmidt J, Pearl RH, Seyfer AE. Small intestinal transplantation in nonhuman primates. *J Pediatr Surg* 1991; **26**(8): 914-20.
22. Gruessner RW. Large animal models in intestinal transplantation. *Transplant Proc* 1998; **30**(6): 2629-33.
23. Kaneko H, Fischman MA, Buckley TM, Schweizer RT. A comparison of portal versus systemic venous drainage in the pig small-bowel allograft recipient. *Surgery* 1991; **109**(5): 663-70.
24. Cohen DS, Fisher RA, Shapiro JH, et al. Porcine small bowel transplantation with rapamycin-based induction immunosuppression and short-course cyclosporine or FK 506 therapy. *Transplant Proc* 1996; **28**(5): 2501-5.
25. Grant D, Duff J, Zhong R, et al. Successful intestinal transplantation in pigs treated with cyclosporine. *Transplantation* 1988; **45**(2): 279-84.
26. Gruessner RW, Levay-Young BK, Nakhleh RE, et al. Portal donor-specific blood transfusion and mycophenolate mofetil allow steroid avoidance and tacrolimus dose reduction with sustained levels of chimerism in a pig model of intestinal transplantation. *Transplantation* 2004; **77**(10): 1500-6.
27. Pirenne J, Gruessner AC, Benedetti E, et al. Donor-specific unmodified bone marrow transfusion does not facilitate intestinal engraftment after bowel transplantation in a porcine model. *Surgery* 1997; **121**(1): 79-88.
28. Monchik GJ, Russell PS. Transplantation of small bowel in the rat: technical and immunological considerations. *Surgery* 1971; **70**(5): 693-702.
29. Lopez-Fernandez S, Hernandez F, Hernandez-Martin S, et al. [Technical aspects of experimental intestinal transplant]. *Cir Pediatr* 2012; **25**(2): 103-8.
30. Andres AM, Santamaria M, Hernandez-Oliveros F, et al. Difficulties, guidelines and review of developing an acute rejection model after rat intestinal transplantation. *Transpl Immunol* 2016; **36**: 32-41.
31. Hernandez F, Zou Y, Lopez G, et al. Is portal venous outflow better than systemic venous outflow in small bowel transplantation? Experimental study in syngeneic rats. *J Pediatr Surg* 2005; **40**(2): 336-40.
32. Hernandez Oliveros F, Zou Y, Lopez G, et al. Critical assessment of the methods used for detection of bacterial translocation. *Pediatr Surg Int* 2004; **20**(4): 267-70.
33. Wang Z, Hernandez F, Pederiva F, et al. Ischemic preconditioning of the graft for intestinal transplantation in rats. *Pediatr Transplant* 2011; **15**(1): 65-9.
34. Zou Y, Hernandez F, Burgos E, et al. Bacterial translocation in acute rejection after small bowel transplantation in rats. *Pediatr Surg Int* 2005; **21**(3): 208-11.
35. Zou Y, Hernandez F, Burgos E, et al. Organ changes and bacterial translocation in a rat model of chronic rejection after small bowel transplantation. *Transplant Proc* 2006; **38**(5): 1569-72.
36. Kobayashi E, Kamada N, Enosawa S, et al. Comparison of potentiality to induce graft-versus-host reaction with small bowel, pancreas/spleen, and liver transplantation in the rat. *Clin Exp Immunol* 1993; **92**(3): 527-31.
37. Song J, Ito T, Matsuda C, et al. Inhibition of donor-derived T cells trafficking into target organs by FTY720 during acute graft-versus-host disease in small bowel transplantation. *Clin Exp Immunol* 2006; **146**(1): 85-92.

38. Acquazzino MA, Fischer RT, Langnas A, Coulter DW. Refractory autoimmune hemolytic anemia after intestinal transplant responding to conversion from a calcineurin to mTOR inhibitor. *Pediatr Transplant* 2013; **17**(5): 466-71.
39. Botija G, Ybarra M, Ramos E, et al. Autoimmune cytopenia after paediatric intestinal transplantation: a case series. *Transpl Int* 2010; **23**(10): 1033-7.
40. Palmer M, Wettstein PJ, Frelinger JA. Evidence for extensive polymorphism of class I genes in the rat major histocompatibility complex (RT1). *Proc Natl Acad Sci USA* 1983; **80**(24): 7616-20.
41. Smith RN, Amsden A, Sudilovsky O, Coleman N, Margolies R. The alloantibody response in the allogeneically pregnant rat. IV. Analysis of the alloantibody specificities with monoclonal antibodies. *J Immunol* 1986; **136**(11): 4063-9.
42. Butcher GW. A list of monoclonal antibodies specific for alloantigens of the rat. *J Immunogenet* 1987; **14**(2-3): 163-76.
43. Damoiseaux JG, Cautain B, Bernard I, et al. A dominant role for the thymus and MHC genes in determining the peripheral CD4/CD8 T cell ratio in the rat. *J Immunol* 1999; **163**(6): 2983-9.
44. Ruiz P, Bagni A, Brown R, et al. Histological criteria for the identification of acute cellular rejection in human small bowel allografts: results of the pathology workshop at the VIII International Small Bowel Transplant Symposium. *Transplant Proc* 2004; **36**(2): 335-7.
45. Stringa P GM, Andrés AM, Sánchez A, Encinas JL, De la Torre C, Gámez M, López-Santamaría M, Hernández F. Native spleen removal and modified multivisceral transplantation in rats. *Transplantation* 2017; **101**(6S2): 1.
46. Abu-Elmagd KM, Costa G, Bond GJ, et al. Five hundred intestinal and multivisceral transplantations at a single center: major advances with new challenges. *Ann Surg* 2009; **250**(4): 567-81.
47. Reyes J, Todo S, Green M, et al. Graft-versus-host disease after liver and small bowel transplantation in a child. *Clin Transplant* 1997; **11**(5 Pt 1): 345-8.
48. Wu G, Selvaggi G, Nishida S, et al. Graft-versus-host disease after intestinal and multivisceral transplantation. *Transplantation* 2011; **91**(2): 219-24.
49. Wang Z, Hernandez F, Pederiva F, et al. Ischemic preconditioning of the graft for intestinal transplantation in rats. *Pediatr Transplant* 2011; **15**(1): 65-9.
50. Zou Y, Hernandez F, Burgos E, et al. Bacterial translocation in acute rejection after small bowel transplantation in rats. *Pediatr Surg Int* 2005; **21**(3): 208-11.
51. Zou Y, Hernandez F, Burgos E, et al. Organ changes and bacterial translocation in a rat model of chronic rejection after small bowel transplantation. *Transplant Proc* 2006; **38**(5): 1569-72.
52. Galvao FH, Waisberg DR, Cruz RJ, Jr., Chaib E, Carneiro D'Albuquerque LA. Modified multivisceral transplantation in the rat. *Transplantation* 2013; **96**(2): e3-4.
53. Stringa P RD, Lausada N, Papa R, Zanuzzi C, Martín P, Abate JC, Cabanne A, Arnal Nathalie, Vecchio L, Milesi V, Portiansky E, Gondolesi G, Rumbo M. Gut permeability and glucose absorption are affected at early stages of graft rejection in a small bowel transplant model. *Transplant direct* 2017.
54. Shin CR, Nathan J, Alonso M, et al. Incidence of acute and chronic graft-versus-host disease and donor T-cell chimerism after small bowel or combined organ transplantation. *J Pediatr Surg* 2011; **46**(9): 1732-8.

55. Murase N, Demetris AJ, Woo J, et al. Graft-versus-host disease after brown Norway-to-Lewis and Lewis-to-Brown Norway rat intestinal transplantation under FK506. *Transplantation* 1993; **55**(1): 1-7.
56. Starzl TE, Demetris AJ, Murase N, Ildstad S, Ricordi C, Trucco M. Cell migration, chimerism, and graft acceptance. *Lancet* 1992; **339**(8809): 1579-82.
57. Zhang Y, Ruiz P. Solid organ transplant-associated acute graft-versus-host disease. *Arch Pathol Lab Med* 2010; **134**(8): 1220-4.
58. Zuber J, Sykes M. Mechanisms of Mixed Chimerism-Based Transplant Tolerance. *Trends Immunol* 2017; **38**(11): 829-43.

ANEXO B: FUENTES Y RECURSOS DE COMUNICACIÓN CIENTÍFICA

1. Umberto Eco. Cómo se hace una tesis. Técnicas y procedimientos de estudio, investigación y escritura. Gedisa; 1998.
2. Maquedano Martínez ML, y Ríos Blanco JJ. Modelo de Presentación de la Tesis Doctoral en Ciencias de la Salud, 2010. Página web de Universo abierto. Acceso en 12/11/2017.
3. American Medical Association. *Manual of Style, a guide for authors and editors*. 9th ed. Pennsylvania. EEUU. Lippincott Williams&Wilkins; 1998.
4. Fundación del español urgente. Disponible en: www.fundeu.es. Acceso en 12/11/2017

.

ANEXO C: ÍNDICE ANTROPONÍMICO

Billingham, RE: 17, 57.

Carrell, Alexis: 15.

Deltz, Eberhard: 16

Dudrick, Stanley J: 19.

Galvao, FH: 61

Goulet, Olivier: 16.

Grant, David: 16

Kobayashi, E: 20

Lillehei, Richard C: 15.

Monchick, GJ: 20

Rusell, PS: 20

Stringa, P: 58.

Wilmore, Douglas W: 19.

ANEXO E: CURRICULUM VITAE RELACIONADO CON ESTA TESIS.

1. Formación.

- Título Responsable de diseño y dirección de procedimientos en experimentación animal: Categoría C.

2. Premios, becas y estancias en el extranjero.

- Premio a la mejor comunicación Congreso de la Sociedad Española de Gastroenterología y Hepatología Pediátrica, Valencia 2004, por el trabajo: “Resultados de un programa de trasplante intestinal”.
- Premio Ordesa 2002 de la Sociedad Española de Gastroenterología, Hepatología y Nutrición Pediátrica. Tratamiento con nutrición enteral precoz en niños con quemaduras graves. Respuesta inflamatoria y clínica.
- Premio “Mariano Benavente” sobre nutrición Infantil Patrocinado por Nestlé. Sociedad de Pediatría de Madrid y Castilla – La Mancha., por el trabajo: Comparación de dos modalidades de drenaje venoso del injerto en un modelo singénico de trasplante intestinal en ratas.
- Beca Formación Continuada hospital universitario La Paz para estancias en el extranjero. Convocatoria 2010. Tema: Estancia de 6 meses en Miami University, Transplant Institute, Jackson Memorial Health System.
- Francisco Hernández Oliveros, Ane M. Andrés, Manuel López Santamaría. “Trasplante intestinal. Indicaciones, técnica y complicaciones”. En: SEGHP, ed. Tratamiento en gastroenterología, hepatología y nutrición pediátrica. 3ª ed. Madrid, 2012, pp. ISBN: 978841535113.
- Miller University Hospital. Miami. Enero-Julio 2011. (Visitor and Research Scholar) Rotación para el estudio del Trasplante Multivisceral.

3. Capítulos de libro.

- Francisco Hernández Oliveros, Ane M. Andrés, Jose Luis Encinas Hernández, Manuel López Santamaría. “Trasplante intestinal. Indicaciones, técnica y complicaciones” En ERGON. Ed. Trasplante Hepático en niños. 2ªed. En

Prensa.M López Santamaría, F Hernández Oliveros. Trasplante intestinal. En: Valentín Cuervas-Mons Martínez, ed. *Introducción al trasplante de órganos y tejidos*. Madrid, 2010.

- Manuel López Santamaría and Francisco Hernández Oliveros. Intestinal Transplant in Hirschsprung disease and Intestinal Pseudoobstruction. In: Ramón Nuñez and Manuel López-Álonso, eds. *Hirschsprung's disease:Diagnosis and Treatment*. Nova Science Publishers, Inc. New York. 2009

4. Artículos publicados.

- Stringa, Pablo; Gómez, Manuel; Andrés, Ane Miren; Sánchez, Alba; Encinas, José Luis; De La Torre, Carlos; Gámez, Manuel; López-Santamaría, Manuel; Hernández, Francisco. "Native Spleen Removal and Modified Multivisceral Transplantation in Rats". *Transplantation* 2017, 101: S100.
- Andres Am, Alameda A, Mayoral O, Hernandez F, Dominguez E, Martinez Ojinaga E, Ramos E, Prieto G, Lopez Santamaría M, Tovar Ja "Health-related quality of life in pediatric intestinal transplantation".. *Pediatr Transplant*. 2014 Nov;18(7):746-56. doi: 10.1111/petr.12348. Epub 2014 Sep 2. PubMed PMID: 25180826.
- Ramos E, Hernández F, Andrés A, Martínez Ojinaga E, Molina M, Sarriá J, López Santamaría M, Prieto G. "Post transplant lymphoproliferative disorders and other malignancies after pediatric intestinal transplantation. Incidence, clinical features and outcome". *Pediatr Transplant* 2013; 17: 472-478. PubMed PMID: 23730927.
- Hernandez F, Andrés A, Encinas J, Dominguez E, Gamez M, Murcia J, Leal N, Martínez L, Molina M, Ramos E, Sarriá J, Martinez Ojinaga E, Prieto G, López Santamaría M. "Preservation of the native spleen in multivisceral transplantation". *Pediatr Transplant* 2013; 17: 556-560. PubMed PMID: 23890077.
- Wang Z, Hernandez F, Pederiva F, Andrés AM, Leal N, Burgos E, Martínez MP, Molina M, Santamaría ML, Tovar JA. Ischemic preconditioning of the

- graft for intestinal transplantation in rats. *Pediatr Transplant*. 2011 Feb;15(1):65-9.
- Andres AM, Lopez Santamaría M, Ramos E, Hernandez F, Prieto G, Encinas J, Leal N, Molina M, Sarriá J, Tovar J. The use of sirolimus as a rescue therapy in pediatric intestinal transplant recipients. *Pediatr Transplant*. 2010 Nov;14(7):931-5.
 - Ischemic preconditioning of the graft for intestinal transplantation in rats. Wang Z, Hernandez F, Pederiva F, Andrés AM, Leal N, Burgos E, Martínez MP, Molina M, Santamaría ML, Tovar JA. *Pediatr Transplant*. 2011;15(1):65-69
 - *Graft-vs-host disease after small bowel transplantation in children*. Andres AM, Santamaría ML, Ramos E, Sarriá J, Molina M, Hernandez F, Encinas JL, Larrauri J, Prieto G, Tovar JA. *J Pediatr Surg*. 2010 Feb;45(2):330-336.
 - Zou Y, Hernandez F, Burgos E, Martinez L, Gonzalez-Reyes S, Fernandez-Dumont V, Lopez G, Romero M, Lopez-Santamaria M Y Tovar Ja: Organ changes and bacterial translocation in a rat model of chronic rejection after small bowel transplantation. *Transplant Proc*, 38: 1569-72.
 - Zou, Y., Hernandez, F., Burgos, E., Martinez, L., Gonzalez-Reyes, S., Fernandez-Dumont, V., Lopez, G., Romero,M., Lopez-Santamaría, M., Tovar, J.A. :Bacterial translocation in acute rejection after small bowel transplantation in rats. *Pediatr Surg Int*, .21: 208-11, 2005.
 - Hernandez, F., Zou, Y., Lopez, G., Romero, M., Martinez ,L., Gonzalez-Reyes, S., Garcia, A., Pena P., Lopez Santamaria, M., Tovar,. J.A.: Is portal venous outflow better than systemic outflow in small bowel transplantation?. Experimental study in syngeneic rats. *J Pediatr Surg*, 40: 336-40, 2005.
 - Lopez-Santamaria M, Gamez M, Murcia M, Leal N, Hernandez F, de Vicente E, Quijano Y, Prieto G, Frauca E, Sarria J, Molina M, Polanco I, Jara P, Tovar J. Pediatric intestinal transplantation. *Transplant Proc*. 2003 Aug;35(5):1927-8.
 - Hernández F, Zou Y, López G, Romero M, Martínez L, González-Reyes S, García A, Peña P, Tovar JA. Critical assessment of the methods used for detection of bacterial translocation. *Ped Surg Int* 2004;20:267-70.

- Manuel López Santamaría, Francisco Hernández Oliveros. Estado actual del trasplante de intestino. Boletín informativo de la Sociedad Madrileña de Trasplantes. Enero, 2012

5. Proyectos de investigación.

- Inducción de tolerancia mediante el uso de progenitores hematopoyéticos en un modelo experimental de trasplante intestinal alogénico. Proyecto financiado por Fundación Mutua Madrileña, 2 años de duración. Presupuesto: 40290€. (IP: Francisco Hernández Oliveros)
- de un modelo de trasplante multivisceral modificado en ratas. Proyecto interno financiado por IDIPAZ, 2 años. Presupuesto: 30000€.
- Inmunomodulación en el trasplante de intestino por medio de células mesenquimales. Estudio preclínico *in vivo*. INMUNO-MODULACIÓN EN EL TRASPLANTE DE INTESTINO POR MEDIO DE CÉLULAS MESENQUIMALES. ESTUDIO PRE-CLÍNICO “IN VIVO”. Entidad financiadora: Asociación Española de Niños y Niñas con Nutrición Parenteral (NUPA). Duración: 2013-2015 (IP: Marta Navarro Zorraquino. Investigadores colaboradores: Manuel López Santamaría, Francisco Hernández Oliveros, Ane Andrés, Sergio López Fernández).
- “Aplicación *in situ* de células mesenquimales por medio de nanotecnología en un modelo experimental de trasplante de intestino en rata. Entidad financiadora: Asociación Española de Niños y Niñas con Nutrición Parenteral (NUPA). Duración: 2013-2015 (I.P.: Marta Navarro Zorraquino. Investigadores colaboradores: Manuel López Santamaría, Francisco Hernández Oliveros, Ane Andrés, Sergio López Fernández).
- “Influencia del preconditionamiento isquémico en el rechazo y la translocación bacteriana en el trasplante intestinal en la rata”. *Ayuda de Investigación FIS*. Proyecto de tres años de duración, 34.485 €. IP: Francisco Hernández Oliveros. Expediente: PI070905.
- “Translocación bacteriana y rechazo crónico. Influencia de la inclusión del colon en el injerto”, Ayuda de investigación por la CAM. Expediente: GR/SAL/0921/2004 (Investigador principal: Luis Lassaletta Garbayo).